

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**“DISEÑO Y DESARROLLO DE *Synechocystis sp.* RECOMBINANTE
COMO PRODUCTORA DE AZÚCARES NO REDUCTORES A
PARTIR DE CO₂ COMO FUENTE DE CARBONO.”**

Por

HUMBERTO GEOVANI ROSAS MEJIA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

A g o s t o , 2 0 2 0

“DISEÑO Y DESARROLLO DE *Synechocystis sp.* RECOMBINANTE
COMO PRODUCTORA DE AZÚCARES NO REDUCTORES A PARTIR
DE CO₂ COMO FUENTE DE CARBONO.”

Revisión de tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez
ASESOR

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
COMITÉ TUTORIAL

Dr. Pasiano Rivas García
COMITÉ TUTORIAL

Dr. Jorge Mauricio Montfort Gardeazabal
COMITÉ TUTORIAL

Agradecimientos

Las circunstancias en las que uno nace no tienen importancia, es lo que uno hace con el don de la vida lo que nos dice quiénes somos. – Mewtwo

Por medio de este apartado quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado en este momento tan importante de mi vida, que no solo me ha cambiado profesional y académicamente, también ha traído grandes enseñanzas como persona.

Agradecimiento obligado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, sin la cual no tendría sustento económico.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas, a las cuales estoy orgulloso de pertenecer.

A mi asesor de tesis el Dr. Rubén Morones agradecer la confianza, apoyo y enseñanzas.

Agradecimientos a mi comité tutorial por el apoyo y nuevas enseñanzas y por su paciencia hacia mí.

Un agradecimiento especial para mis compañeros de laboratorio, los cuales se volvieron un segundo asesor y segundos maestros.

Agradezco a todos mis amigos a los cuales les dedicaré esta etapa.

Dedicatoria

A mi abuelita Tila, que sé que estaría muy orgullosa por continuar estudiando y superándome. Y a mi abuelito por todo el apoyo que siempre me ha brindado.

A mi madre Juana María, mis hermanos Miguel y Mariana, mis tíos Laura y Carlos y mis primos Juan Carlos y Diego por compartir tantos años conmigo y brindarme todo el apoyo posible.

También va dedicada para David que prácticamente estuviste conmigo en la recta final de este nuevo proyecto y aunque las cosas cambien ya nuestras vidas se fusionaron, y por qué no también tienes un espacio aquí.

A mis amigos ingenieros mi segunda familia y las mejores personas que me dio la ingeniería química que, aunque ya no los veo, sé que siempre estaremos allí para cuando nos necesitemos Brenda, Karina, Kenia, César y Zapata gracias por todo.

Para Makoa me dio otras grandes amistades, aprendizajes y una razón de vida, también va dedicada para esas personas que conocí allí, Edgar, Lulú y Daniela mis expresidentes favoritos.

Índice general

Nomenclatura	7
Lista de figuras	10
Resumen	12
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Las Cianobacterias.	14
1.2 <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803.	15
1.3 El gen <i>cscB</i> .	16
1.4 Fuentes de carbono.	18
2. ANTECEDENTES	20
2.1 Ingeniería genética en cianobacterias.	20
2.2 Secreción de sacarosa en cianobacterias.	21
3. ENFOQUE, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3.1 Enfoque	23
3.2 Hipótesis	23
3.3 Objetivo general	24
3.4 Objetivos específicos	24
4. METODOLOGÍA	25
4.1 Materiales, reactivos y equipos.	25
4.2 Diseño y construcción del plásmido pEC BG.	26
4.3 Transformación de la cepa de <i>Escherichia coli DH5α</i> electro competente usando el plásmido pEC BG.	27
4.4 Selección de colonias y extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli DH5α</i> .	28
4.5 Análisis de restricción del ADN extraído	29

4.6	Transformación natural de <i>Synechocystis sp. PCC 6803</i> .-----	29
4.7	Extracción de ADN genómico y plasmídico de <i>Synechocystis sp.</i> -----	30
4.8	Confirmación de integración mediante PCR -----	30
4.9	Cuantificación de azúcares totales mediante Fenol- Ácido Sulfúrico-----	31
4.1	Producción de sacarosa induciendo un shock osmótico y cuantificación de azúcares totales mediante Fenol- Ácido Sulfúrico.-----	31
4.2	Crecimiento de <i>Corynebacterium glutamicum</i> en medio BG11 con sacarosa. -----	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES -----	33
5.1	Diseño, construcción y clonación del plásmido pEC BG -----	33
5.2	Transformación natural de <i>Synechocystis sp. PCC 6803</i> .-----	40
5.3	Confirmación de integración mediante PCR.-----	42
5.4	Producción de sacarosa induciendo un shock osmótico y cuantificación de azúcares totales mediante Fenol- Ácido Sulfúrico.-----	44
5.4.1	Crecimiento de <i>Corynebacterium glutamicum</i> en medio BG11 con sacarosa. -----	49
6.	CONCLUSIONES -----	52
7.	REFERENCIAS -----	53
8.	ANEXOS -----	58
	Soluciones-----	58
	Secuencias -----	59

Nomenclatura

GENES Y PLÁSMIDOS

cscB:

Gen que codifica para la proteína Sacarosa permeasa.

pUC57:

Vector de clonación que contiene el gen *cscB*.

pEERM3 Km:

Plásmido para integración dentro del sitio neutral de *Synechocystis sp.* PCC 6803.

ORGANISMOS

Synechocystis sp. PCC 6803 (ATCC 27184)

Corynebacterium glutamicum (ATCC 13032)

Escherichia coli DH5α

SIGLAS

ADN:

Ácido desoxirribonucleico.

DNTP's:

Desoxiadenosina trifosfato

BG-11:

Blue-Green Medium, Medio verde azulado (fórmula en anexos).

PCR:

Polimerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa.

RBS:

Ribosome Binding Site, sitio de unión a ribosoma.

UNIDADES

cm:
Centímetros.

h:
Horas.

kg:
Kilogramos.

min:
Minutos.

mL:
Mililitros.

ng:
Nanogramos.

nm:
Nanómetros.

pH:
Potencial de hidrógeno.

ppm:
Partes por millón.

rpm:
Revoluciones por minuto.

s:
Segundos.

μm :
Micrómetros.

μM :
Micromolar.

μL :

Microlitros.

µg:

Microgramos.

C:

Grados Celsius.

%:

Por ciento.

Lista de figuras

Figura. 1: Mecanismo de recombinación homóloga. (Imagen adaptada de Englund *et al.*, 2015)

Figura. 2: Representación *in silico* del plásmido pEC BG. (Imagen adaptada de Englund *et al.*, 2015)

Figura. 3: Caracterización *in silico* del plásmido pEC BG en la plataforma de benchling utilizando la enzima *EcoRV*, en el carril Ladder marcador de peso molecular 12 kb, carril 1 muestra la muestra con las 2 bandas esperadas (3.2 y 2 kb) y carril 2 control negativo con solo una banda 4 kb.

Figura 4: Amplificación del gen *cscB* utilizando primers de extracción. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo (Sin ADN molde), carril 3 banda aproximada de 1.3kb referente al gen *cscB*.

Figura. 5: Digestión del plásmido pEERM3 Km utilizando enzimas *XbaI* y *PstI*. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo (Sin enzimas) y carril 3 plásmido linealizado (3.9kb).

Figura. 6: Ligación del pEERM3 Km linealizado y el gen *cscB*. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 construcción del plásmido pEC BG, carril 3 control negativo (Sin ligasa).

Figura. 7: (A) Control de viabilidad celular, células electroporadas sin plásmido y placa LB sin kanamicina. (B) Viabilidad de antibiótico, placa LB con 50 ppm de kanamicina y células sin electroporar. (C y D) Muestran las colonias crecidas en placas LB con 50 ppm de kanamicina, las cuales pueden presentar el plásmido.

Figura. 8: Extracción de ADN plasmídico de 4 colonias crecidas en placa agar LB.

Figura. 9: Digestión de plásmidos pEC BG extraídos de colonias utilizando la enzima *EcoRV*, en el carril 1 marcador de peso molecular 10 kb, carril 2 control negativo con solo una banda 4 kb, carril 3 pertenece a C4 que muestra las 2 bandas esperadas (3.2 y 2 kb) y carril 4 pertenece a la cepa 1 con un plásmido no identificado.

Figura. 10: Matrices con *Synechocystis* sp en medio BG11, utilizada para realizar la modificación genética.

Figura. 11: Viales stock con *Synechocystis* sp en medio BG11.

Figura. 12: Transformación natural de células de *Synechocystis* sp. incubadas por 14 días. (A, B y C) Muestras colocadas sobre placas de agar BG-11 con 5 (A), 10 (C) y 15 (B) ppm de kanamicina que muestran crecimiento de colonias. (D) Viabilidad de antibiótico

en placa agar BG-11 con 5 ppm de kanamicina con células sin plásmido. (E) Placa de viabilidad celular sin antibiótico.

Figura. 13: PCR de confirmación de la integración del gen *CscB* realizada a 4 colonias. Carril 1 marcador de peso molecular Biobasic Plus 100 – 5,000 bp, Carril 2 Control positivo (plásmido pEC BG). Carril 3 control negativo (ADN genómico de cepa sin transformar) y carriles 4 a 7 muestras transformadas.

Figura. 14: Crecimiento de una de las colonias confirmadas (Matraces A) y cepa WT (Matraces H) en distintas concentraciones de kanamicina (15, 25 y 50 ppm) incubadas por 5 días.

Figura. 15: Curva de crecimiento para la producción de sacarosa. Donde WT es la cepa Wild type de *Synechocystis* sp. PCC3803, C es la cepa transformada y CI es la cepa inducida desde el inicio de la incubación, realizado por triplicado. Las barras en cada punto indica la desviación estándar de la muestra.

Figura. 16: Curva de calibración de concentración de azúcares totales realizada usando distintas concentraciones de sacarosa (0, 50, 100, 150 y 200 mg/L). Realizado por triplicado. Las barras en cada punto indica la desviación estándar de la muestra.

Figura. 17: Crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* en distintos medios con sacarosa a 1 g/L. Medio BG11 al 1x, 2x, 3x y medio mineral descrito anteriormente. Realizado por triplicado. Las barras en cada punto indica la desviación estándar de la muestra.

Figura. 18: Comparativa de iones presentes en el medio mineral y medio BG11.

Figura. 19: Visualización detallada de los iones hierro (II) y manganeso. Resaltando la presencia de manganeso a una concentración similar en el medio BG11 3x.

Resumen

Humberto Geovani Rosas Mejia

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación: Julio, 2020.

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Título del estudio: “Diseño y desarrollo de *Synechocystis sp.* recombinante como productora de azúcares no reductores a partir de CO₂ como fuente de carbono.”

Área de Estudio: Procesos biotecnológicos.

Número de páginas:

Propósito y método del estudio: La obtención de diversas sustancias químicas de consumo humano conlleva repercusiones en el impacto ambiental por su compleja síntesis química. En las últimas décadas se ha optado por el desarrollo de procesos biotecnológicos con el fin de reducir costos, impactos ambientales y facilitar la síntesis de sustancias químicas. El crecimiento y función biológica de los microorganismos, principales actores de los procesos de bioproducción, requieren de una fuente de carbono. Sin embargo, los sustratos de carbono y su obtención han tenido poca innovación en los últimos años, es por esto por lo que este proyecto propone la utilización de CO₂, con lo que estaremos fortaleciendo la competencia de bioproducción industrial al mismo tiempo de aportar en la reducción del impacto ambiental de los procesos de producción actuales.

Contribuciones y conclusiones: En el presente proyecto se desarrolló la primera etapa de una plataforma de producción de una gran diversidad de metabolitos de interés humano a partir de co-cultivos que utilicen como fuente de carbono el dióxido de carbono, en este proyecto se desarrolló al organismo genéticamente modificado que servirá como suministrador de fuente de carbono para el crecimiento de otra especie biológica que sea inoculada en el reactor. Con la primera etapa de la plataforma de co-cultivos propuesta en este proyecto se propone contar en un futuro con una red de producción 99% productiva, rentable y sustentable.

En el presente trabajo se desarrolló una cepa de cianobacteria mediante ingeniería genética capaz de secretar sacarosa bajo condiciones de estrés. Este organismo a diferencia de los reportados en la literatura es capaz de crecer sin la presencia factores selectivos, como antibióticos, ya que la modificación genética sugiere estar integrada en el genoma de esta. La tecnología reportada en este proyecto permite continuar la segunda fase del proyecto con la perspectiva en realizar sistemas de co-cultivo para la producción de diversos metabolitos a nivel industrial.

Introducción

1.1 Las Cianobacterias.

Las cianobacterias fueron los primeros microorganismos en aparecer sobre la tierra y se sabe que están relacionadas filogenéticamente con las bacterias Gram-positivas (Brock *et al.*, 2009). Tienen la capacidad y la importante labor de producir oxígeno y de fijar CO₂ mediante el ciclo de Calvin catalizado por ribulosa 1, 5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO). Esta enzima es degradada por el oxígeno, sin embargo, *Synechocystis sp.* PCC 6803 ha desarrollado un orgánulo llamado carboxisoma que tiene la capacidad de encapsular y proteger a la RuBisCO (Yu *et al.*, 2013). Las cianobacterias son de un subgrupo de las bacterias Gram-negativas y se pueden encontrar en la mayoría de los ambientes acuáticos, en gran variedad de ambientes y bajo innumerables condiciones. Por tal motivo, presentan una gran aplicabilidad tecnológica, por ejemplo, se ha demostrado que producen una gran variedad de pigmentos, enzimas y vitaminas y gracias a los bajos requerimientos nutricionales de las cianobacterias todo esto se puede escalar a nivel industrial para su producción (Kima *et al.*, 2016).

Para la generación de bioenergía las cianobacterias presentan una gran oportunidad de explotar esta capacidad, debido a su diversidad de producción de lípidos que son sintetizados en su interior, la cual es estimulada por diferentes factores de estrés a los que se expone en el medio ambiente el microorganismo. Estos incrementos en producción de lípidos permiten que las cianobacterias sean utilizadas en la producción de biodiesel ya que se ha observado que pueden lograr producir hasta 100 veces más lípidos que otros

microorganismos reportados en la literatura (Rittmann *et al.*, 2008). Aunado a esto, las cianobacterias tienen bajos requerimientos nutricionales y a su vez cuentan con una alta capacidad de proliferación de biomasa, la cual se ha reportado que se puede utilizar para la producción de metano e hidrógeno (Rittmann *et al.*, 2008).

1.2 *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Synechocystis sp. PCC 6803 tiene la capacidad de crecer foto autotróficamente y foto heterotróficamente, como fuentes de nitrógeno puede utilizar nitrato y amonio, pero no tiene la capacidad de asimilar N₂ (Yu *et al.*, 2013). Comúnmente se cultiva en medio BG-11, a una temperatura de 30°C, pH entre 7 y 8 en fotorreactores (Yu *et al.*, 2013). La reducción de fosfoglicerato que es un intermediario en el ciclo de Calvin y la glucólisis limita el crecimiento autótrofo por la falta de ATP / NADPH (Yu *et al.*, 2013).

Mediante los fotosistemas I y II que contienen clorofila, las cianobacterias tienen la capacidad de utilizar la energía lumínica para obtener fotones y ser utilizados para dividir moléculas de agua en oxígeno e hidrógeno (Heinz *et al.*, 2016).

Las cianobacterias como *Synechocystis* sp. PCC 6803 son capaces de acumular sacarosa (Reed *et al.*, 1985), que es un disacárido con una amplia abundancia en el reino vegetal ya que prácticamente todas las frutas y semillas tienen este compuesto; actualmente la sacarosa se extrae de la caña de azúcar o remolacha azucarera (Beyer *et al.*, 1987). La acumulación de este hidrato de carbono se da en su citoplasma como una medida de equilibrio entre la presión osmótica del medio y el interior de la célula; sin embargo, uno de los grandes retos para obtener la sacarosa es el hecho de que se produce

intracelularmente por lo que su extracción se vuelve un proceso complicado y costoso de *DownStream* (Du *et al.*, 2013).

1.3 El gen *cscB*.

La asimilación de los carbohidratos en las células ha sido un amplio tema de estudio desde hace siglos, por tal motivo las vías o rutas degradativas de los azúcares están prácticamente establecidas. El primer paso en el catabolismo es transportar los carbohidratos al interior de la célula a través de la membrana celular. Las proteínas encargadas de este proceso pertenecen a un grupo llamado superfamilia de facilitadores principales (MFS) en la cual están incluidas 28 familias que se encuentran ampliamente reconocidas y se sabe que pueden transportar gran diversidad de sustratos hacia dentro o hacia fuera de la célula además también pueden mantener un equilibrio de sustrato en la membrana sin direccionalidad, todo esto gracias a la polaridad dirigida (Pao *et al.*, 1998).

Para cualquier sustrato con carga neutra que se transporte a través de la membrana sin el movimiento de alguna otra especie molecular se puede denominar un transporte *Uniport*, en caso de que se acumule cualquier sustrato neutro en contra de un gradiente de concentración, generalmente esto se da gracias al co-transporte mediante el acoplamiento (*Symport*) de algún catión monovalente ya sea H^+ o Na^+ (West *et al.*, 1997). El sustrato puede presentar preferencia a más de un ion, así mismo la acumulación del sustrato dependerá del gradiente electroquímico del catión que se transporta conjuntamente (Winke *et al.*, 1999).

En bacterias se extienden tres familias específicas pertenecientes a los MFS cuya función es la absorción de gran variedad de azúcares (Pao *et al.*, 1998). Una de esas familias es la de oligosacáridos la cual tiene un mecanismo *Symport* H^+ que incluye a la permeasa lactosa (LacY) que ya se encuentra perfectamente caracterizada, así como otros transportes específicos de las bacterias para sacarosa y rafinosa. LacY co-transporta un H^+ acompañado a una molécula de azúcar (Varela *et al.*, 1996; Kaback *et al.*, 1997). El gen *cscB* de *E. coli* codifica a una proteína que se conoce como transportador de sacarosa perteneciente a la familia oligosacárido *Symport* H^+ (OHS por sus siglas en inglés) (Pao *et al.*, 1998).

La sacarosa (también maltosa, fructosa y lactosa) se importa normalmente hacia la célula mediante *Symport* de protones; a su vez, el proceso de secreción de sacarosa hacia el exterior de la célula se logra mediante la inversión del flujo de protones el cual se logra mediante un incremento en la concentración salina del medio (Ducat *et al.*, 2012).

1.4 Fuentes de carbono.

En las últimas dos décadas se han tenido grandes avances en el desarrollo de bioprocesos y la industrialización de microorganismos para lograr ampliar los métodos de producción de productos químicos, biocombustibles y algunos agentes terapéuticos todo a partir de fuentes biológicas (Zhu *et al.*, 2008). La mayoría de las bacterias empleadas actualmente para la generación de gran variedad de productos son heterótrofas; sin embargo, requieren una fuente de energía y carbono que pueden representar hasta un 60% de los costos de insumos (Pimentel *et al.*, 2008). La materia prima utilizada como fuente de carbono y energía generalmente proviene de la agricultura, por ejemplo, remolacha azucarera, maíz o caña de azúcar (Sims *et al.* 2008). La cosecha de caña de azúcar actualmente está envuelta en una gran controversia, ya que los países productores reportan incendios descontrolados que genera una deforestación mayor a 5,000 hectáreas anuales y esto solo en el país de el Salvador (Cabrera *et al.*, 2010). Ambientalistas han recomendado evitar la quema ya que ocasiona grandes problemas ambientales como el desprender monóxido de nitrógeno el cual tiene efectos tóxicos sobre los humanos, anhídrido sulfuroso que al unirse con el agua atmosférica forma la llamada lluvia ácida, anhídrido carbónico en reacción fotoquímica produce irritación en los ojos y afecta las vías respiratorias (Cabrera *et al.*, 2010). La quema de cultivos puede alcanzar hasta 735°C ocasionando la esterilización del suelo alterando la población bacteriana, microclima, alteración de la humedad, modificación de climas en la región y desprendimiento de partículas menores a 2.5 micrómetros (García *et al.*, 2012).

En los últimos años los procesos biotecnológicos se han catalogado como una competencia para los mercados de alimentos y para las tierras de cultivos agrícolas, por

tal motivo, el desarrollo de alternativas biológicas a combustibles fósiles y productos químicos han desatado una gran controversia por que ocasionan un incremento e inestabilidad en costos de productos alimenticios(Timilsina *et al.*, 2012). De los principales carbohidratos utilizados en la industria se encuentra la sacarosa que es una fuente de carbono para muchos microorganismos; por ejemplo, para *Corynebacterium glutamicum* que es el principal productor de ácido glutámico, el cual cuenta con una alta demanda en la industria de alimentos por su acción potenciadora del sabor (Hernández *et al.*, 2003).

Antecedentes

2.1 Ingeniería genética en cianobacterias.

La gran mayoría de las cianobacterias son manipulables genéticamente mediante distintas técnicas; por ejemplo, electroporación, ultrasonido, luz ultravioleta y transformación natural (Zang *et al.*, 2007). Esta última se ha reportado que presenta la mayor eficiencia de transformantes para la cepa de *Synhrocystis sp.* PCC6803 que es hasta 1×10^{-5} en eficiencia de transformación en comparación con otras técnicas moleculares ya mencionadas (Zang *et al.*, 2007). De acuerdo con la literatura *Synhrocystis sp.* PCC6803 tiene la capacidad de recolectar ADN exógeno bajo ciertas condiciones. Si el fragmento cuenta con secuencias homólogas a las del genoma de la cianobacteria ocasiona un proceso de recombinación sin caracterizar, permitiendo incorporar el fragmento al genoma de la cianobacteria; esta habilidad explicaría la eficiencia de la transformación natural (Zang *et al.*, 2007).

El plásmido pEERM3 Km (**Figura. 1**) tiene la capacidad de integrar una región de sí mismo en el genoma de *Synechocystis sp.* PCC 6803, el vector cuenta con dos regiones homólogas al sitio neutral de la cianobacteria (*UpStream* y *DownStream*) ubicado en la región slr1068. Una vez dentro de la célula parte del plásmido se pliega e intercambia una región con el genoma mediante homología. Entre lo más relevante que se integra de plásmido es: el promotor (*PnrsB*) cuyo inductor es el ion Níquel, el RBS, el o los injertos, el terminador (BBa_B0015) y la resistencia a kanamicina (Englund *et al.*, 2015).

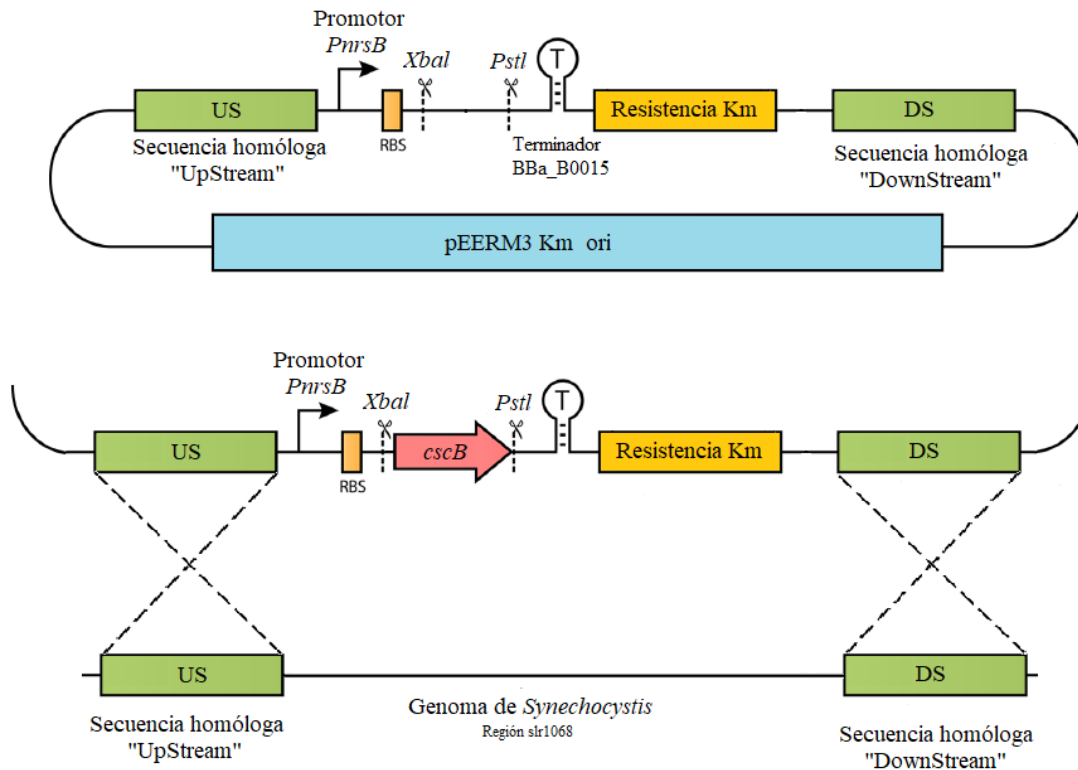


Figura. 1: Mecanismo de recombinación homóloga. (Imagen adaptada de Englund *et al.*, 2015)

2.2 Secreción de sacarosa en cianobacterias.

Previamente, se han realizado diversos estudios en los que se demostró la producción de sacarosa en cianobacterias. Por ejemplo, *Synechococcus elongatus*, fue modificada genéticamente con el gen *cscB* para la producción de sacarosa. Sin embargo, la producción no fue mayor al 10mM. Además, se observó que este disacárido no pudo ser reincorporado nuevamente al espacio intracelular y que su presencia en el medio no estuvo asociada con muerte celular (Ducat *et al.*, 2012).

Como consecuencia de la modificación genética una cepa de *Synechococcus elongatus* produjo mayor densidad celular a comparación de la cepa silvestre, esto se debe a una mayor actividad del fotosistema II en cual incrementó la tasa de fijación del dióxido de carbono, sin embargo, depende de antibiótico en el medio de cultivo para poder mantener esta capacidad (Ducat *et al.*, 2012).

Específicamente para *Synechocystis sp.* PCC 6803 se han realizado trabajos previos en los cuales se aprovecha la ingeniería genética para propiciar la expresión del gen *cscB* y así lograr secretar aproximadamente 140 mg/L de sacarosa en 250 horas suplementando el medio BG-11 con 400mM de NaCl, IPTG como inductor y kanamicina en el medio de cultivo (Du *et al.*, 2013).

Enfoque, Hipótesis y Objetivos

3.1 Enfoque

Desarrollar una plataforma de producción de metabolitos que sean obtenidos a partir de microorganismos, utilizando CO₂ proveniente del aire como fuente principal de carbono, además de luz y un medio mineral.

Al utilizar como materia prima principal aire y disminuir la cantidad de reactores en los procesos, se puede lograr un gran ahorro económico y al mismo tiempo se contribuye a la disminución de las emisiones de CO₂ al ambiente.

3.2 Hipótesis

Synechocystis tendrá la capacidad de secretar sacarosa al ser modificada genéticamente integrando el gen *cscB* mediante recombinación homóloga.

3.3 Objetivo general

Diseñar y desarrollar una cepa de *Synechocystis sp.* recombinante para la producción de sacarosa a partir de CO₂, luz y medio mineral.

3.4 Objetivos específicos

1. Diseño y construcción del plásmido pEC BG.
2. Transformación de la cepa de *Escherichia coli* DH5α electrocompetente usando el plásmido pEC BG.
3. Construir una cepa de *Synechocystis sp.* recombínate utilizando el gen *cscB*.
4. Producir sacarosa utilizando la cianobacteria recombinante.
5. Evaluación de la compatibilidad nutricional de *Corynebacterium glutamicum* en el medio de cultivo de *Synechocystis sp.* recombinante.

Metodología

4.1 Materiales, reactivos y equipos.

Para las diversas pruebas a realizar en el presente proyecto se utilizó el siguiente material: Cajas Petri de plástico marca VWR, matraces Erlenmeyer de 125, 250 y 500 mL marca PYREX, tubos de ensayo de 15 y 50 mL marca Corning, placas de 96 pocillos marca Corning, celdas para espectrofotómetro de 10mm marca Brand, micropipetas de 0.1-2.5, 0.5-10, 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000 μ L y 0.5-5 mL con sus respectivas puntillas marca Eppendorf, frascos de vidrio con rosca de 250 y 1000 mL marca DURAN, tubos para microcentrífuga de 0.2, 0.6 y 1.5 mL, membrana de filtración Supor-450 47mm 0.45 μ m marca PALL, filtros para jeringa estéril de PES 0.22 μ m 30mm de diámetro marca CELLTREAT, tubería de precisión Masterflex L/S 16 de silicón curado en platino.

De los reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto se utilizaron: medio de cultivo LB Miller (Difco), agar bacteriológico (BD Bioxon) y medio BG-11 50x (Sigma-Aldrich). Las sales de metales utilizadas son $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y NaCl (Desarrollo de Especialidades Químicas). Solución de lisis I (5 mL de tris-HCl 1M y 4 mL de EDTA 0.5M en 200 mL de H_2O destilada, solución de lisis II (4 mL NaOH 10N y 2 g de SDS en 200 mL de H_2O destilada), solución de lisis III (58.8g de acetato de potasio y 23 mL de ácido acético en H_2O destilada). Como antibióticos utilizados: ampicilina y kanamicina (Sigma-Aldrich). Otros reactivos utilizados: agarosa, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, ácido sulfúrico y fenol.

Los equipos utilizados se encuentran en el laboratorio de Biología Sintética y de Sistemas (LBSS) en el Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIByN) dentro del Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT): Incubadora estática y con agitación marca LAB TECH modelo LSI-3016R, autoclave automática marca JEIO TECH modelo AAHL1035K, refrigerador y congelador marca Norlake, espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus, lector de placas Multiskan GO marca Thermo Scientific, centrifuga con refrigeración LEGEND XFR de Thermo Scientific, balanza analítica AND modelo GR-200, NanoDrop BIOSPEC-NANO de SHIMADZU, campana de flujo laminar nivel II de LABCONCO, termociclador Prime Thermal Cycle de THECNE, ThermoMixer C de eppendorf, microscopio MICROMASTER de Fisher Scientific y Vortex Genie de Scientific Industries.

4.2 Diseño y construcción del plásmido pEC BG.

Para lograr secretar sacarosa es necesario expresar una proteína de membrana (Sacarosa permeasa) mediante el gen *cscB*, la secuencia nucleotídica (Véase anexo de secuencias) fue obtenida de UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P30000>) sufrió una optimización de codones (Véase anexo de secuencias) para *Synechocystis* PCC6803 en la plataforma IDT (Integrated DNA Technologies) y solicitado a la casa comercial BIOBASIC INC. clonado en el vector PUC57 con los sitios de restricción de las enzimas *XbaI* y *PstI*. El gen fue amplificado mediante PCR con cebadores específicos de extracción FOPU (TGCCACCTGACGTCTAAGAAGATATC) y REPU (ATTACCGCCTTTGAGTGAGCATATC) de la casa comercial T4OLIGO posteriormente fue purificado con SureClean (Bioline), el vector que será utilizado en

Synechocystis será el pEERM3 Km (Addgene) (Véase anexo de secuencias) tiene la capacidad de integrarse en el genoma de la cianobacteria mediante recombinación homóloga, pEERM3 Km fue digerido utilizando las enzimas *XbaI* y *PstI* ambas de JenaBioScience y el fragmento purificado con SureClean.

Después de la ligación del fragmento *cscB* en el vector pEERM3 Km, se utilizó la enzima *EcoRV* para caracterizarlo, la cual realiza dos cortes uno en el gen y el otro en el vector pEERM3 Km, esperando dos productos de 2 y 3.2 kb.

4.3 Transformación de la cepa de *Escherichia coli* DH5α electro competente usando el plásmido pEC BG.

El plásmido pEC BG fue transformado en una cepa de *Escherichia coli* DH5α con el fin de obtener una gran cantidad de copias de este, y así poder transformar nuestra cepa de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

El protocolo utilizado se describe a continuación (modificación Sambrook, 2012):

Se incubó un cultivo de 50 mL de medio LB durante una noche, se tomó una alícuota de 20 µL y se agregaron 100 ng del plásmido (junto con alícuotas sin ADN como control). Las bacterias fueron transferidas a una celda de 0.2 cm y fue sometida a un pulso de 2,500 V. Inmediatamente se agregaron 200 µL de medio LB y el contenido fue colocado en tubos de 1.5 mL e incubados en ThermoMixer a 37°C por una hora. Para finalizar, las células fueron cultivadas por extensión en placa sobre agar-LB con 50 ppm de kanamicina como marcador de selección.

4.4 Selección de colonias y extracción de ADN plasmídico de

E. coli DH5α.

Las colonias que lograron crecer en las placas fueron cultivadas durante una noche en 1 mL de medio LB a 37°C con 50 ppm de kanamicina, posteriormente se realizó un cultivo de 10 mL e incubados durante una noche bajo las mismas condiciones.

Se tomaron 1.5 mL y se extrajo ADN plasmídico utilizando el procedimiento de lisis alcalina que se describe a continuación:

La muestra fue centrifugada a 14,000 rpm durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante, al paquete celular se agregaron 200 µL de la solución I (Véase anexo de soluciones) junto con 10 µL de RNAsa concentrada y se mezcló en Vortex e incubó a 37°C durante 5 minutos, inmediatamente se agregaron 200 µL de la solución II (Véase anexo de soluciones) esta vez se mezcló por inversión e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se agregaron 200 µL de la solución III (Véase anexo de soluciones) se mezcló por inversión e incubó a 4°C por 5 minutos.

La muestra fue sometida a 14,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue transferido a tubos nuevos y se agregó 1 mL de etanol al 100% y se incubó a -20°C por 2 horas.

Se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 20 minutos y se retiró el sobrenadante, se agregaron al tubo 200 µL de etanol al 70% y se mezcló en Vortex, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos para retirar el sobrenadante y dejar secar el contenido del tubo, una vez seco, se agregan 20 µL de agua ultra pura estéril, se midió en NanoDrop para conocer la concentración de ADN y corrieron las muestras en un gel de agarosa al 0.7% para confirmar la buena integridad del ADN.

4.5 Análisis de restricción del ADN extraído

Se utilizó la enzima de restricción Eco32I de la compañía Thermo Scientific™ en las siguientes cantidades Agua ultra pura estéril 15 μ L, Buffer 10X 2 μ L, plásmido 1 μ g y enzima 1 μ g, dejando incubar a 37°C durante 30 minutos para posteriormente ser corridos en un gel de agarosa 1% con sus respectivos controles y marcador de peso molecular Hyperladder 1 kb de marca Bioline.

4.6 Transformación natural de *Synechocystis sp. PCC 6803*.

En un matraz de 125 mL se inocularon 2 mL de un cultivo de *Synechocystis sp. PCC 6803* en 50 mL de medio BG11 para ser incubados a 28°C, 100 rpm, fotoperiodos de 12:12, aireación y 60 μ E $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Al tener una OD₇₃₀ de 0.7 (Aproximadamente en 3 días) se tomaron los 50 mL y fueron centrifugados a 4,190xg por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y resuspendió en 25 mL de medio fresco y se repitió 3 veces el procedimiento anterior. El pellet fue resuspendido para obtener una OD₇₃₀ de 2.5. Se tomaron 0.4 mL para ser colocados en tubos transparentes de 1.5 mL. Se añadieron 10 y 15 μ g de ADN y se agitó manualmente, además se colocaron muestras sin ADN como control negativo. Los tubos se incubaron por 6 horas a 28°C, sin agitación (Se agitaron manualmente a la hora 3), fotoperiodos de 12:12, y 60 μ E $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se tomaron 0.2 mL para ser expandidos sobre una membrana estéril (Supor-450 47 mm 0.45 μ m) ubicada en cajas Petri con agar BG-11 sin antibiótico y fueron incubadas a las condiciones anteriores. Después de 24 horas el filtro fue removido y colocado en placas con agar BG-11 con

kanamicina a las siguientes concentraciones 5, 10 y 15 ppm, colocando muestras de control en placas con y sin antibiótico. Después de 3 semanas aparecieron colonias que fueron levantadas y propagadas en 1 mL de medio BG-11.

4.7 Extracción de ADN genómico y plasmídico de

Synechocystis sp.

Se utilizó QuickClean II Plasmid Miniprep Kit (GenScript) para la extracción de ADN plasmídico y One-4-All Genomic DNA Mini-Preps Kit (Bio Basic) para la obtención del ADN genómico y se midió en NanoDrop para conocer la concentración de ADN.

4.8 Confirmación de integración mediante PCR

Se diseñaron un par de primers SynF (ATTGGAGTGGTAATCATGGC) y SynR (TACAATACCCAGAGAGGAGG) los cuales amplifican una región del gen *cscB* con las siguientes temperaturas y tiempos de trabajo: Desnaturalización inicial de 95°C por 180s, desnaturalización de 95°C por 15s, alineamiento de 59.5°C por 15s, extensión 72°C por 30 s, extensión final de 72°C por 30s y 30 ciclos. Una vez realizada la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% con sus respectivos controles y utilizando el marcador de peso molecular Biobasic Plus 100 – 5,000 bp.

4.9 Cuantificación de azúcares totales mediante Fenol- Ácido Sulfúrico

Para analizar la producción de sacarosa se empleó el método de DuBois *et al.* (1956) el cual consistió en hacer reaccionar 1 mL de la muestra que contiene sacarosa con 1 mL fenol al 5% y agregando inmediatamente 5 mL ácido sulfúrico concentrado para producir furfural e hidroximetilfurfural dejando enfriar por 10 minutos, posteriormente se agitó y se dejó reposar por 20 minutos para ser medidos a una longitud de onda de 484 nm en microplaca en un equipo Multiskan. Se repitió el procedimiento con estándares de sacarosa a una concentración de 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mg/L por triplicado.

4.1 Producción de sacarosa induciendo un shock osmótico y cuantificación de azúcares totales mediante Fenol- Ácido Sulfúrico.

Se comparó la producción de sacarosa en la cepa transformada al ocasionar un shock osmótico de 0.4 M de NaCl al día 8 de incubación, el experimento consistió en tres matraces de 125 mL con 50 mL de medio BG-11 (Realizado por triplicado) en los cuales se incubaron células de *Synechocystis* sin transformar (WT) como control, células transformadas inducidas (CI) desde el tiempo 0 con Ni^{+} a una concentración final de 2.5 μM y células transformadas las cuales fueron inducidas al día 8 (C), CI y C contenían 25 ppm de kanamicina, no se colocó inyección de aire, fueron incubadas a 28°C, 110 rpm, aproximadamente 50 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ y fotoperiodos 12:12. Se tomó muestra de 1 mL cada 24 horas para realizar una curva de crecimiento midiendo a una longitud de onda de 730 nm en un espectrofotómetro. Después de realizar el shock osmótico al día 8 se tomó una

muestra y fue centrifugada a 10,000 rpm por 10 minutos, se tomaron 0.2 mL y se aforaron a 1 mL y se analizó la concentración de carbohidratos en el sobrenadante mediante el método reportado por (DuBois *et al.*, 1956).

4.2 Crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* en medio

BG11 con sacarosa.

Se inoculó *C. glutamicum* en 50 mL de Caldo Nutritivo (CN) en un matraz de 250 mL durante 24 horas, 37°C y 150 rpm, se tomó 1 mL para ser lavados 3 veces con medio BG11 para así eliminar CN residual y asegurarnos que solo utilice los nutrientes del medio BG11 y la sacarosa añadida.

La muestra fue inoculada en tubos de 1.5 mL con 1.2 mL de medio BG11 en concentraciones de 1x, 2x, 3x adicionado con 0.06 ppm de biotina y 0.06 ppm de tiamina, medio mineral (Amin *et al.*, 2007) dedicado para el crecimiento de la bacteria que contiene; 5.1 g/L MgSO₄, 5 ppm FeSO₄, 5 ppm MnSO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 1 g/L K₂SO₄, 0.06 ppm de biotina, 0.06 ppm de tiamina y 7 g/L de (NH₄)₂SO₄. Se agregó sacarosa para tener una concentración final de 1 g/L y se midió la densidad óptica a 600 nm como día 0 y los tubos se incubaron por triplicado en un ThermoMixer a 37°C, 900 rpm y durante 5 días.

Resultados y discusiones

5.1 Diseño, construcción y clonación del plásmido pEC BG

La construcción *in silico* (**Figura. 2**) del plásmido pEC BG dio como resultado un plásmido con un tamaño aproximado de 5,100 pares de bases. Como partes relevantes de la construcción se resalta la secuencia del gen *cscB*, la resistencia a kanamicina, el origen de replicación, promotor *PnrsB*, el terminador BBa_B0015, los sitios de corte de las enzimas utilizadas (*XbaI* y *PstI*) y las secuencias homólogas (*UpStream* y *DownStream*) al sitio neutral de *Synechocystis* en la región slr1068. Al realizar el análisis de restricción *in silico*, con la enzima *XhoI*, obtenemos como resultado positivo dos bandas, de 2.9 kb y otra de 1 kb, teniendo como control negativo una banda de 3.9 kb (**Figura. 3**). La presencia de una sola banda indica un solo reconocimiento de la secuencia de corte para *XhoI* concordando con lo reportado (Englund *et al.*, 2015), el gen *cscB* también cuenta con una secuencia de reconocimiento para *XhoI*, al contar con dos secuencias de reconocimiento en el vector, se generan dos bandas debido a los cortes ocasionados por la enzima de restricción (Salazar *et al.*, 2013)

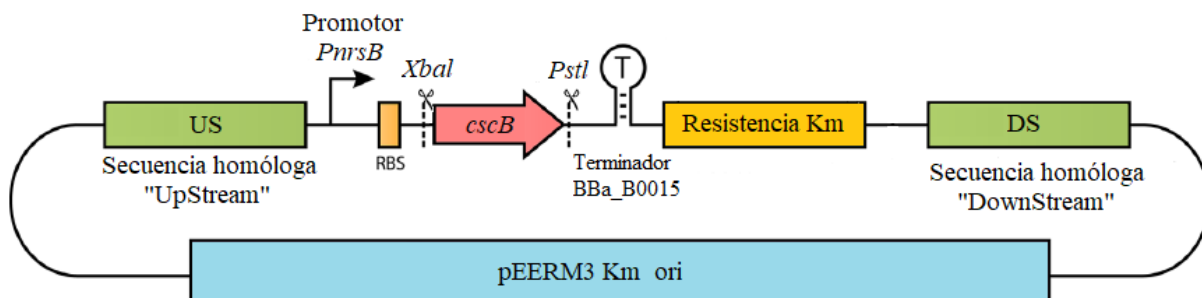


Figura. 2: Representación *in silico* del plásmido pEC BG.
(Imagen adaptada de Englund *et al.*, 2015)

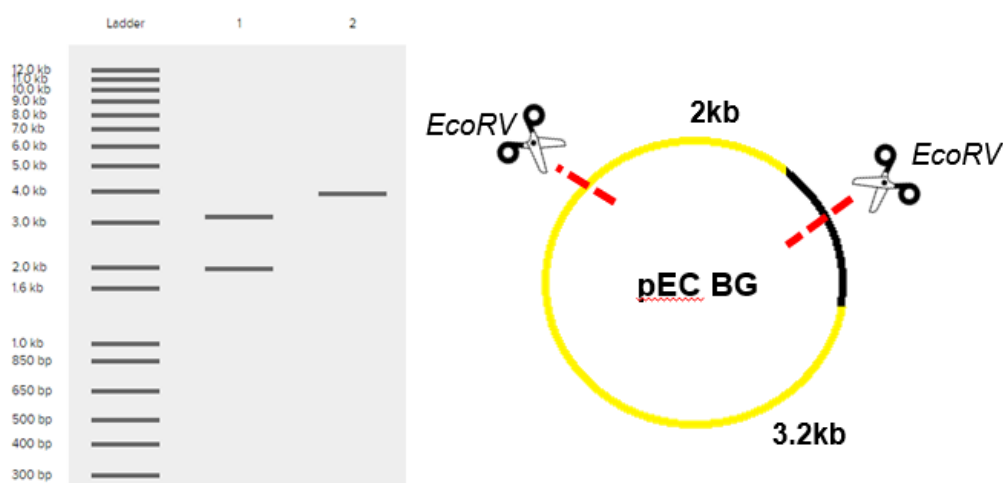


Figura. 3: Caracterización *in silico* del plásmido pEC BG en la plataforma de benchling utilizando la enzima *EcoRV*, en el carril Ladder marcador de peso molecular 12 kb, carril 1 muestra la muestra con las 2 bandas esperadas (3.2 y 2 kb) y carril 2 control negativo con solo una banda de 4 kb.

Se procedió a la amplificación del gen *cscB*. Los resultados (**Figura. 4**) del gel de agarosa muestran que en el carril 1: el marcador de peso molecular, carril 2: el control negativo el cual no contiene plásmido sin polimerasa y por ende no se observa amplicón, en el carril 3: una banda aproximadamente de 1.3 pares de bases perteneciente al gen, se observa una gran concentración debido al exceso de ADN molde empleado en la reacción de PCR.

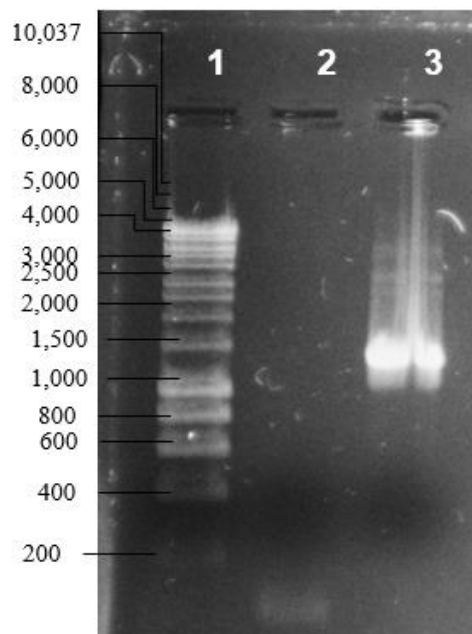


Figura. 4: Amplificación del gen *cscB* utilizando primers de extracción. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo (sin ADN molde), carril 3 banda aproximada de 1.3kb referente al gen *cscB*.

Como siguiente paso se procedió a la digestión del plásmido pEERM3 Km con el fin de linealizar el vector. Como se mencionó anteriormente se llevó a cabo con las enzimas de restricción *XbaI* y *PstI*. La evidencia de este procedimiento se aprecia en la **Figura. 5** y muestra el carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo (sin enzimas) y carril 3 plásmido linealizado (3.9kb). La ligación del gen *cscB* y pEERM3 Km linealizado se muestra en la **Figura. 6** carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: construcción del plásmido pEC BG mostrando 3 bandas características del plásmido, esto dependiendo del enrollamiento del ADN (relajado, enrollado y superenrollado) (Tu *et al.*, 2015), carril 3 control negativo (sin ligasa) que muestra las bandas del gen y el plásmido de 3.9 y 1.3 kb respectivamente.

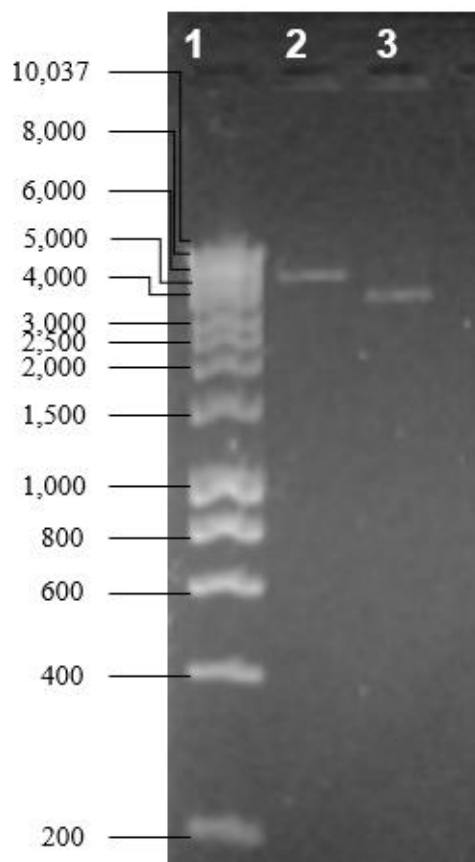


Figura. 5: Digestión del plásmido pEERM3 Km utilizando enzimas *XbaI* y *PstI*. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo (sin enzimas) y carril 3 plásmido linealizado (3.9kb).

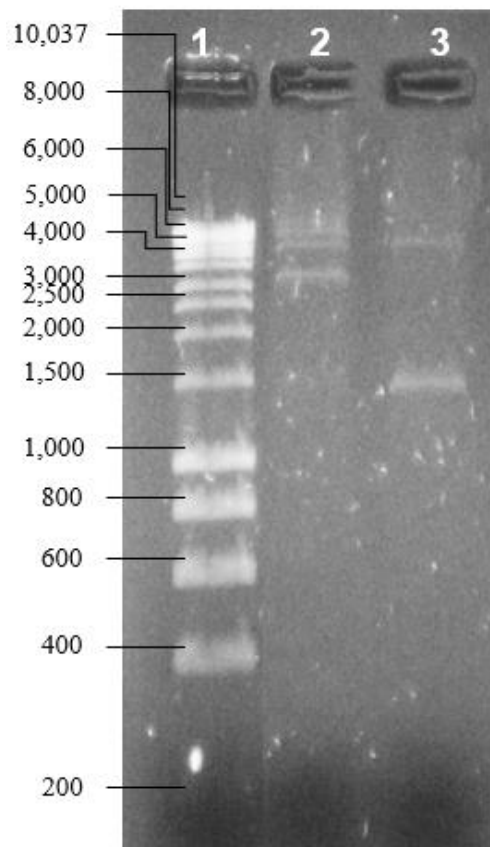


Figura. 6: Ligación del pEERM3 Km linealizado y el gen *cscB*. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 construcción del plásmido pEC BG, carril 3 control negativo (sin ligasa).

La **Figura. 7** muestra las placas que comprueban transformación de *E. coli* con el plásmido pEC BG con sus respectivos controles. La **Figura. 7A** muestra la placa de viabilidad celular, el agar LB no contiene Kanamicina por lo cual las células que resistieron el impulso eléctrico en el electroporador crecieron al no morir por el mismo impulso, la **Figura. 7B** muestra la placa de LB que contiene el antibiótico y la actividad de este, ya que impidió el crecimiento de las células y por lo tanto no se observó viabilidad celular, en la **Figura 7C** y **Figura 7D** se muestran las placas con medio LB y Kanamicina

a 50 ppm. En dichas placas se inocularon células que fueron previamente electroporadas con el plásmido construido las cuales mostraron viabilidad celular, con esto indica que las células que lograron crecer cuentan con resistencia al antibiótico debido a la asimilación del plásmido y la expresión del gen de resistencia a kanamicina (Tu *et al.*, 2015).

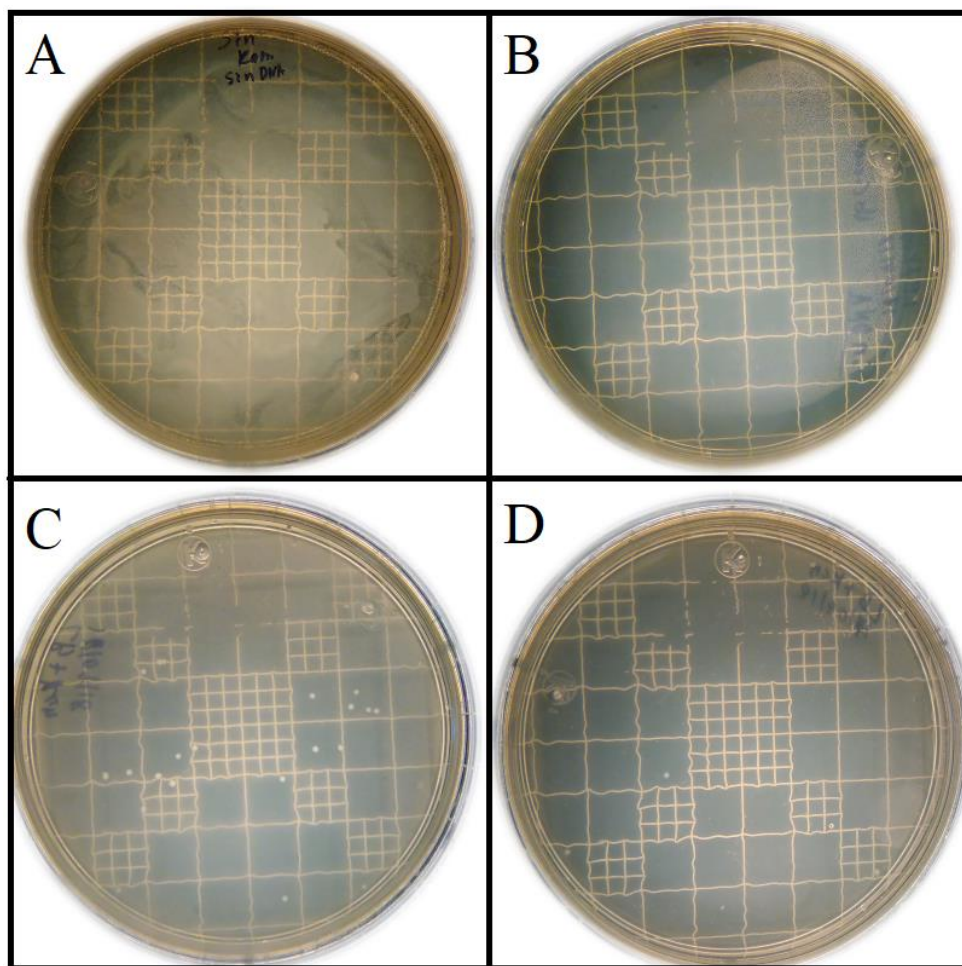


Figura. 7: (A) Control de viabilidad celular, células electroporadas sin plásmido y placa LB sin kanamicina. (B) Viabilidad de antibiótico, placa LB con 50 ppm de kanamicina y células sin electroporar. (C y D) Muestran las colonias crecidas en placas LB con 50 ppm de kanamicina, las cuales pueden presentar el plásmido.

De las colonias donde se infiere que cuentan con el plásmido (**Figura. 7**) se seleccionaron y propagaron 4 colonias, a las cuales se les extrajo el ADN plasmídico, el resultado de este procedimiento se observa en la **Figura. 8**, donde se puede apreciar que las cepas C2, C3 y C4 contienen el mismo plásmido en tanto que la cepa C1 contiene otro, esto de acuerdo con su peso ya que difiere con las otras cepas. Con la finalidad de confirmar cuál de ellos es el vector pEC BG se realizó la digestión del ADN plasmídico (**Figura. 9**). En esta figura el carril 3 que pertenece a la cepa C4 muestra las dos bandas esperadas (aproximadamente en 3.2 kb y 2 kb) para el plásmido pEC BG, mientras que el carril 4 que contiene la cepa C1 y el carril 2 que es el control negativo presentan una única banda aproximada en 4 kb y esto indica que sólo cuenta con un sitio de corte reconocible por la enzima de restricción y que no es el plásmido deseado (Salazar *et al.*, 2013).

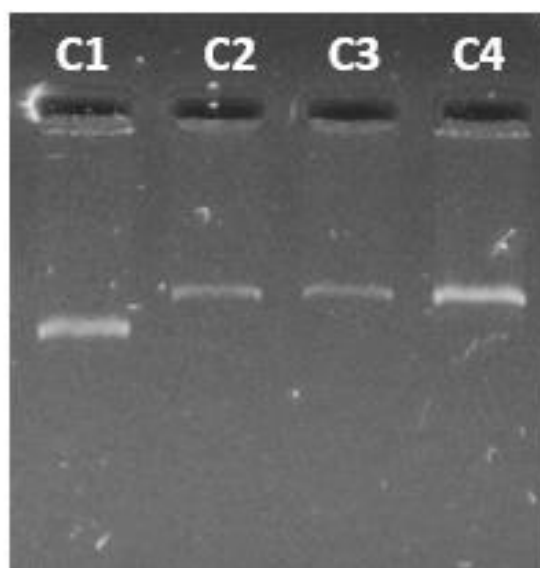


Figura. 8: Extracción de ADN plasmídico de 4 colonias crecidas en placa agar LB.

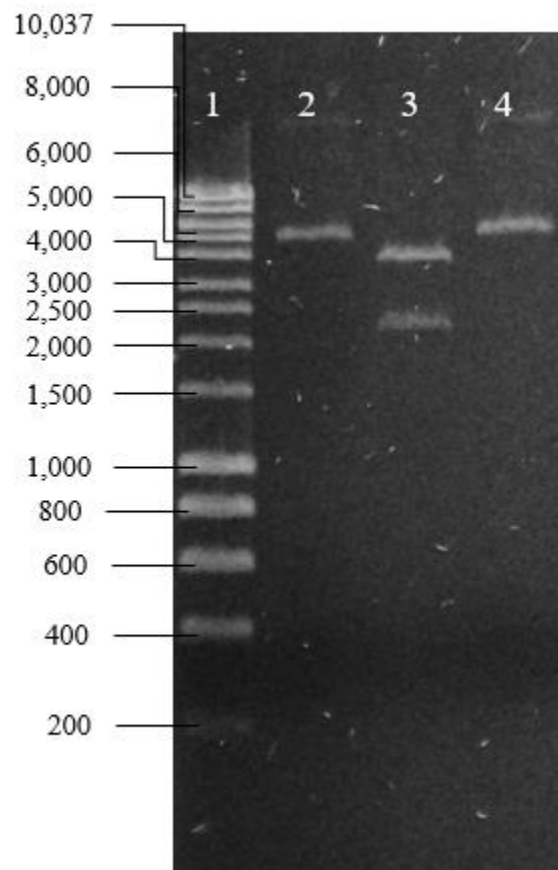


Figura. 9: Digestión de plásmidos pEC BG extraídos de colonias utilizando la enzima *EcoRV*, en el carril 1 marcador de peso molecular 10 kb, carril 2 control negativo con solo una banda 4 kb, carril 3 pertenece a C4 que muestra las 2 bandas esperadas (3.2 y 2 kb) y carril 4 pertenece a la cepa 1 con un plásmido no identificado.

5.2 Transformación natural de *Synechocystis sp. PCC 6803*.

Como resultado del proceso de transformación de *Synechocystis sp. PCC 6803* en medio BG11, las células utilizadas (**Figura. 10**) se crecieron a una densidad óptica de 0.8, medida a 730 nm. Se resguardó un stock en viales para futuros usos (**Figura. 11**). Una vez realizado el procedimiento de transformación natural, después de 2 semanas se observó crecimiento de colonias en los filtros colocados en el agar BG-11 (**Figura. 12**). El crecimiento se dio en las tres concentraciones de kanamicina utilizadas 5, 10 y 15 ppm teniendo un mayor crecimiento en la placa con 10 ppm (**Figura. 12C**) que, en su mayoría a la degradación del antibiótico y del plásmido debido a la prolongada incubación (Zang *et al.*, 2007). El menor crecimiento se observó utilizando 15 ppm (**Figura. 12B**) y 5 ppm (**Figura. 12A**) que se puede atribuir a una mayor dispersión celular sobre el filtro, la cantidad de colonias crecidas es comparable con otros proyectos en los cuales prueban las mejores condiciones de transformación, en los cuales mencionan que la baja eficiencia es común al trabajar con cepas de cianobacterias debido a la irradiación de luz y suministro de aire, las cuales causan degradación del plásmido (Zang *et al.*, 2007). En los controles negativos se observó un incremento en viabilidad celular (**Figura. 12E**) y con ello se evidencia que las células pueden crecer bajo las condiciones establecidas y presentar inhibición a partir de una concentración de 5 ppm del antibiótico kanamicina (Oka *et al.*, 1981) (**Figura. 12D**), tomando en cuenta que todas las muestras fueron incubadas bajo las mismas condiciones previamente mencionadas.



Figura. 10: Matraces con *Synechocystis* sp en medio BG11, utilizada para realizar la modificación genética.



Figura. 11: Viales stock con *Synechocystis* sp en medio BG11.

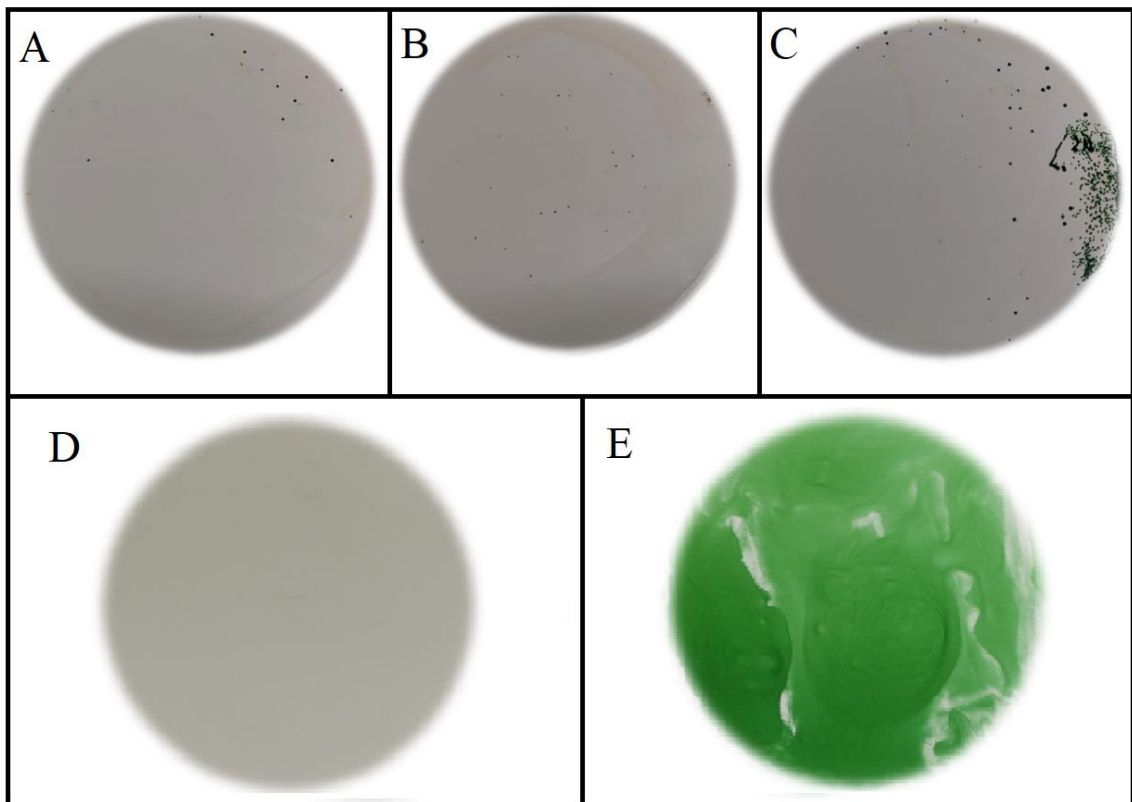


Figura. 12: Transformación natural de células de *Synechocystis* sp. incubadas por 14 días. (A, B y C) Muestras colocadas sobre placas de agar BG-11 con 5 (A), 10 (C) y 15 (B) ppm de kanamicina que muestran crecimiento de colonias. (D) Viabilidad de antibiótico en placa agar BG-11 con 5 ppm de kanamicina con células sin plásmido. (E) Placa de viabilidad celular sin antibiótico.

5.3 Confirmación de integración mediante PCR.

Dado que se pudo obtener ADN genómico en las 4 colonias previamente aisladas, se realizó la PCR de confirmación con los primers SynF F y SynR, los cuales solo amplificaron una región del gen *cscB* aproximada a 200 pares de bases que fue comparada con un marcador de peso molecular con tamaño de 5 kb. La PCR se realizó con sus respectivos controles uno de ellos utilizó plásmido pEC como control positivo ya que contiene el gen y como control negativo el ADN genómico de una cepa no transformada de *Synechocystis sp.* Los resultados de la PCR se pueden apreciar en la **Figura. 13**, donde el carril 2 (control positivo) y carriles del 4 al 7 (muestras transformadas) desarrollaron una banda de aproximadamente 200 pb que corresponde a una región del gen CscB, en tanto que el carril 3 (control negativo) no desarrolló ninguna banda, ya que pertenece a una cepa no transformada.

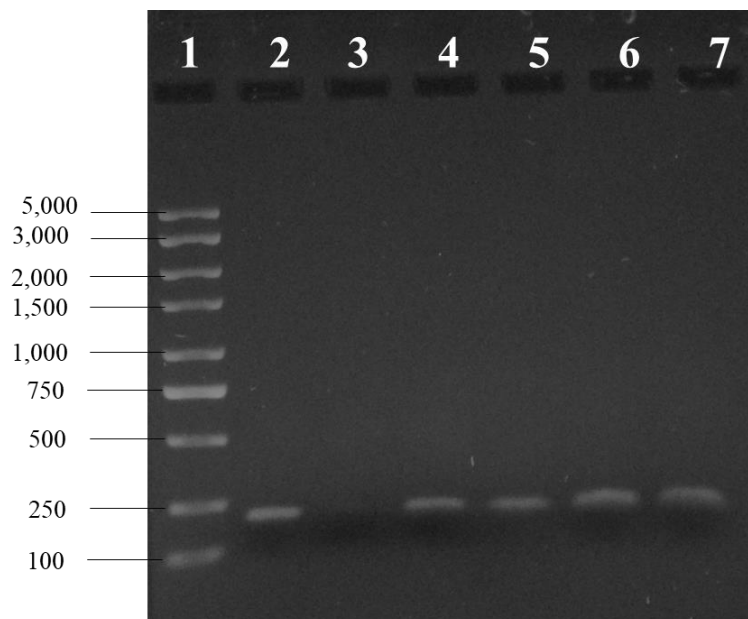


Figura. 13: PCR de confirmación de la integración del gen *CscB* realizada a 4 colonias. Carril 1 marcador de peso molecular Biobasic Plus 100 – 5,000 bp, Carril 2 Control positivo (plásmido pEC BG). Carril 3 control negativo (ADN genómico de cepa sin transformar) y carriles 4 a 7 muestras transformadas.

Como una prueba adicional una de las colonias fue crecida en distintas concentraciones de antibiótico 15, 25 y 50 ppm en medio BG11 y sin aireación, junto con la cepa silvestre (WT) la cual no debería de presentar crecimiento (**Figura. 14**). Los resultados demuestran que la cepa transformada es capaz de crecer en las distintas concentraciones de antibiótico, por ende, confirmamos la adición de la resistencia a kanamicina que proviene del plásmido previamente introducido a la célula. Las concentraciones de kanamicina usadas frecuentemente como marcadores de resistencia en otros vectores van desde concentraciones de 5 ppm (*Oka et al.*, 1981), en las cuales se presenta inhibición y muerte celular debido a la acción del fármaco, en publicaciones recientes han incrementado la concentración del antibiótico para ser utilizado en diversos proyectos reportándose concentraciones que van desde 25 ppm (*Eaton et al.*, 2004) lo cual indica que normalmente a estas concentraciones la cepa Wild Type no presenta crecimiento en el medio de cultivo.



Figura. 14: Crecimiento de una de las colonias confirmadas (Matraces A) y cepa WT (Matraces H) en distintas concentraciones de kanamicina (15, 25 y 50 ppm) incubadas por 5 días.

5.4 Producción de sacarosa induciendo un shock osmótico y cuantificación de azúcares totales mediante Fenol- Ácido Sulfúrico.

Al realizar la curva de crecimiento (**Figura. 15**) la cepa que fue inducida desde el inicio de la incubación (CI) presentó una tasa de crecimiento menor en comparación con las cepas Wild Type (WT) y la transformada pero no inducida (C). Asimismo, ésta última tuvo una menor tasa de crecimiento en comparación con la WT; estos comportamientos se deben a la carga metabólica adicional debido a la adición de gen *cscB* en el genoma de la cianobacteria. Como lo menciona Daniel Ducat (2012) en sus experimentos, la cepa con el gen *cscB* presenta disminución en su tasa de crecimiento en comparación con la cepa Wild Type.

Al día 8 cuando se realizó el shock osmótico y la inducción, todas las cepas presentaron una disminución en su tasa de crecimiento ocasionada por el incremento de la presión osmótica debido a la adición de NaCl, el comportamiento observado concuerda con lo esperado en las cianobacterias, ya que desvían procesos metabólicos para la producción de sacarosa como ósmoprotector (Ducat *et al.*, 2012). Las cepas presentaron una recuperación a partir del día 10 y empezó de nuevo su replicación celular debido a la adaptación de las cepas a la nueva condición de crecimiento; sin embargo, para el día 17 las 3 cepas entraron de nuevo a una fase estacionaria entrando en equilibrio la muerte con el crecimiento celular (**Figura. 15**).

En cuanto a los resultados de cuantificación de azúcares totales únicamente se graficaron los obtenidos con el método Dubois (**Figura. 15**). En esta gráfica puede observarse que

hasta el día 12 de la curva de crecimiento la cepa CI (Sac CI) tuvo presencia de azúcares en el sobrenadante a una concentración de aproximadamente 5 mg/L en comparación con la cepa C (Sac C) que hasta el día 13 pudo detectarse la presencia de azúcares a una concentración de 9.4 mg/L. En tanto que la cepa WT (Sac WT) no presentó producción de azúcares.

Las cepas C y CI presentaron un decremento en la presencia de azúcares en el día 14 lo que pudiera atribuirse a una falla de iluminación, por lo que la cianobacteria usó parte de la sacarosa generada como fuente de carbono para seguir creciendo o bien pudiera atribuirse a una falla en la medición. La máxima concentración de carbohidratos en el medio fue detectada hasta el día 17 en ambas cepas con valores de 20.42 mg/L para la cepa C y 10.14 mg/L para la cepa CI. La doble presencia de azúcares en la cepa C en comparación con la cepa CI podría deberse a una mayor presencia de biomasa, al no ser inducida desde el inicio de la incubación esta cepa concentró el metabolismo para su crecimiento a diferencia de la cepa CI, la cual, si fue inducida y forzada a producir la proteína de membrana sacarosa permeasa, con ello desviando su metabolismo para el ensamble de ésta (Ducat *et al.*, 2012). Al empezar a producir esta proteína desde el día 0 probablemente empiece a perder actividad dentro de la célula, esto explicaría el motivo por el cual se logró secretar una menor cantidad de azúcares (Ducat *et al.*, 2012).

La cepa C que fue inducida al día 8 tardó un día más en producir azúcares, sin embargo, logro secretar más del doble de concentración que la cepa CI. Esta cepa contaba con una mayor densidad celular al momento de la inducción con Níquel, siendo tentativamente un factor determinante para la producción de azúcares, además, concuerda con lo mencionado por Wei Du (2013) y Daniel Ducat (2012) en sus publicaciones la cuales

concluyeron que la manera en la cual se obtiene mayor concentración de sacarosa es induciendo el shock salino al día 8.

La presencia de azúcares en el sobrenadante es baja en comparación con lo reportado por Wei Du (2013) de 120 mg/L utilizando el mismo microorganismo base y con la única diferencia de que ellos inyectaron aire al medio de cultivo y en este trabajo no fue así; sin embargo, para lograr superar la producción ya reportada es necesario optimizar las condiciones de crecimiento realizando un diseño de experimentos en el cual variemos en el pH, flujo de fotones, agregando y variando el flujo masico de aire, agitación y temperatura, podría propiciar un incrementar la cantidad de sacarosa en el sobrenadante. El medio de cultivo se puede modificar al emplear buffer con HEPES o MOPS para lograr mantener el pH en un valor deseado. Tal como lo menciona Daniel Ducat (2012), la cianobacteria es capaz de producir una mayor concentración de sacarosa en pH's por encima de 7.8, lo cual se le atribuye al flujo de protones de la actividad *Symporte* de sacarosa. Al incrementar la concentración de cloruro de amonio se ha demostrado que aumenta la densidad celular (Iijima *et al.*, 2015) y por ende podría tener repercusión en el aumento la producción de sacarosa.

Estos resultados respaldan la adición del gen *cscB* en el sistema de la cianobacteria, las cepas C y CI cuentan con presencia de carbohidratos en el sobrenadante indicando que esté gen se está expresando y por ende permite la salida de sacarosa de la célula. En contraste la cepa WT que es la cepa silvestre no presentó incremento en la presencia de carbohidratos en el sobrenadante dado que esta cepa no cuenta con algún agente integrado en su genoma que permita la salida de la sacarosa. Este comportamiento ya fue reportado en el trabajo de Ducat (2018) utilizando *S. elongatus* para la producción de sacarosa, indicando que la cepa WT no produce sacarosa en el sobrenadante y la cepa modificada

con el mismo gen (Mediante plásmido e IPTG como inductor) utilizado en este trabajo si presenta la capacidad de secretar sacarosa. Se requiere secuenciar el genoma de *Synechocystis sp.* que fue transformada en este trabajo para confirmar que el gen se encuentra integrado en el mismo y no solo en presencia de plásmido.

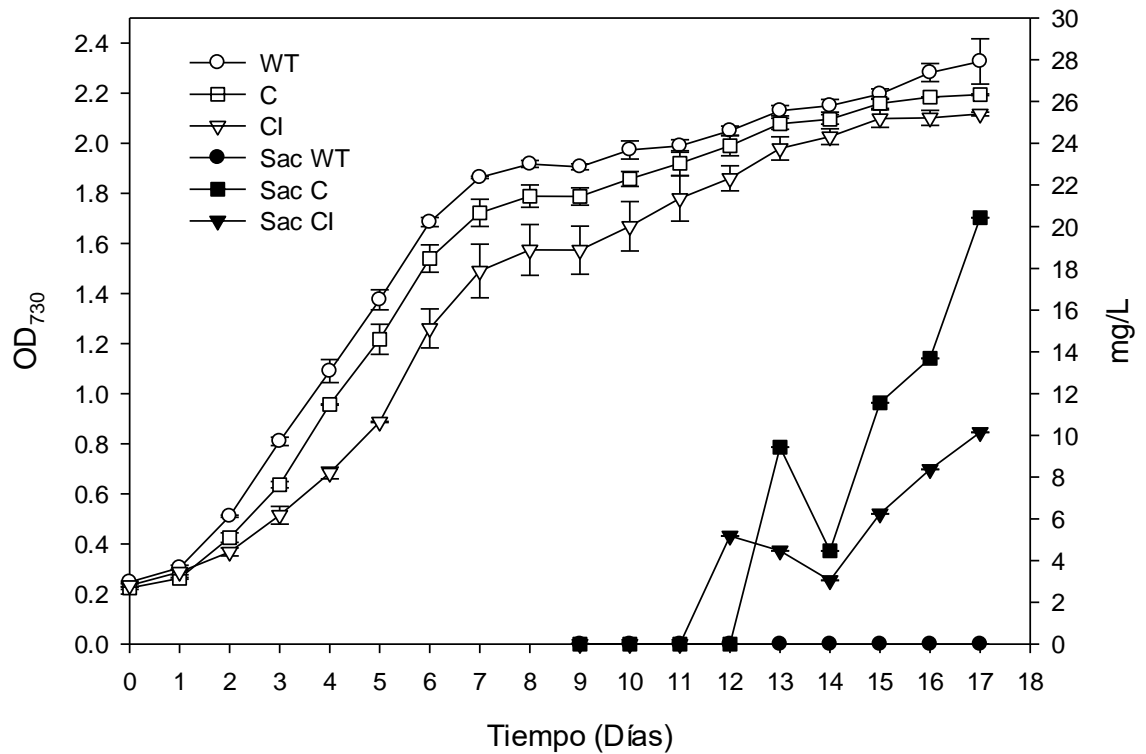


Figura. 15: Curva de crecimiento para la producción de sacarosa. Donde WT es la cepa Wild type de *Synechocystis sp.* PCC3803, C es la cepa transformada y CI es la cepa inducida desde el inicio de la incubación, realizado por triplicado. Las barras en cada punto indica la desviación estándar de la muestra.

Para la cuantificación de azúcares como se mencionó anteriormente se empleó el método de Dubois para lo cual se realizó previamente una curva patrón (**Figura. 16**), dicha gráfica muestra una tendencia y correlación lineal entre las concentraciones. El método menciona realizar la medición a una longitud de onda en 490 nm, sin embargo, realizando un barrido espectral nos dimos cuenta de que el pico provocado por la sacarosa se encuentra en 484

nm para el equipo Multiskan empleado, por tal motivo se decidió trabajar con esa longitud de onda.

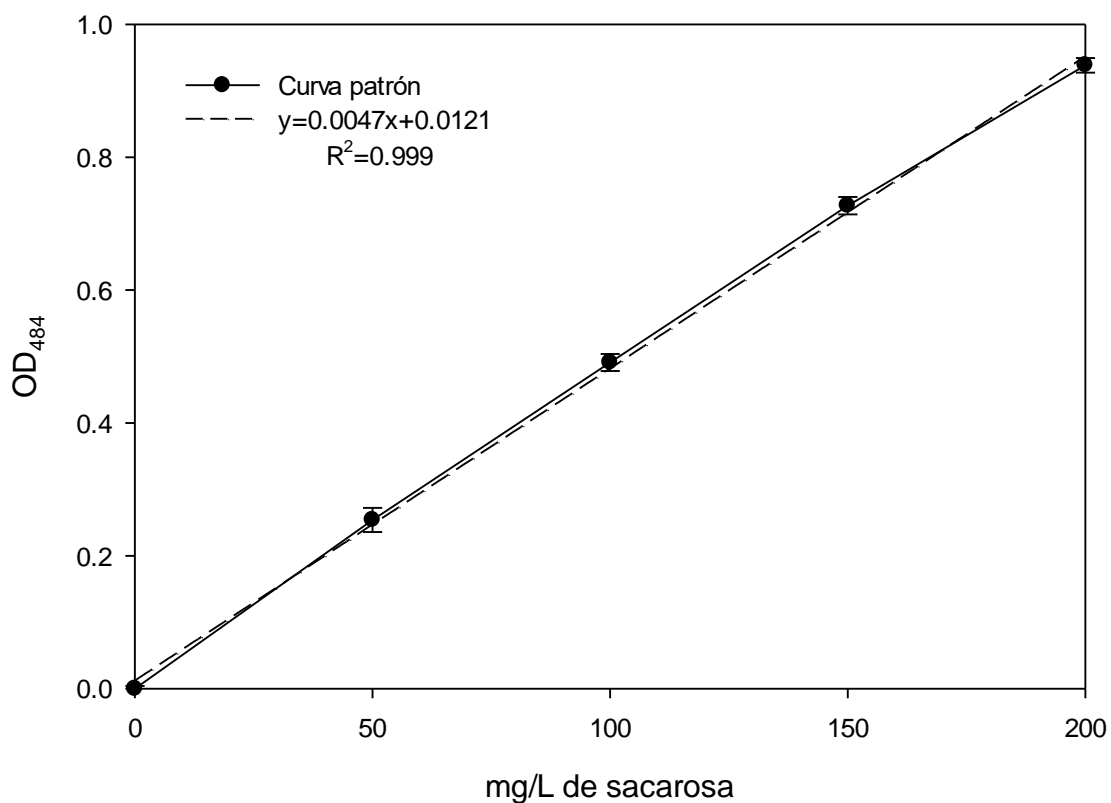


Figura. 16: Curva de calibración de concentración de azúcares totales realizada usando distintas concentraciones de sacarosa (0, 50, 100, 150 y 200 mg/L). Realizado por triplicado. Las barras en cada punto indica la desviación estándar de la muestra.

5.4.1 Crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* en medio

BG11 con sacarosa.

De los medios analizados (BG11 y mineral), *Corynebacterium glutamicum* solamente presentó crecimiento en dos de ellos (**Figura. 17**), el medio mineral y el BG11 a una concentración tres veces mayor a la utilizada normalmente (BG11 3x). Esto indica que fueron los únicos medios capaces de satisfacer los requerimientos nutricionales de este microorganismo. A lo largo de la historia distintos autores han realizado modificaciones del medio mineral tanto para realizar co-cultivos (Shyamkumar *et al.*, 2014) o monocultivos (Amin *et al.*, 2007); sin embargo, se siguen basando en el protocolo original (Kaneko *et al.*, 1979) al mantener la relación de las especies químicas involucradas, relación que se satisface con el medio BG11 3x.

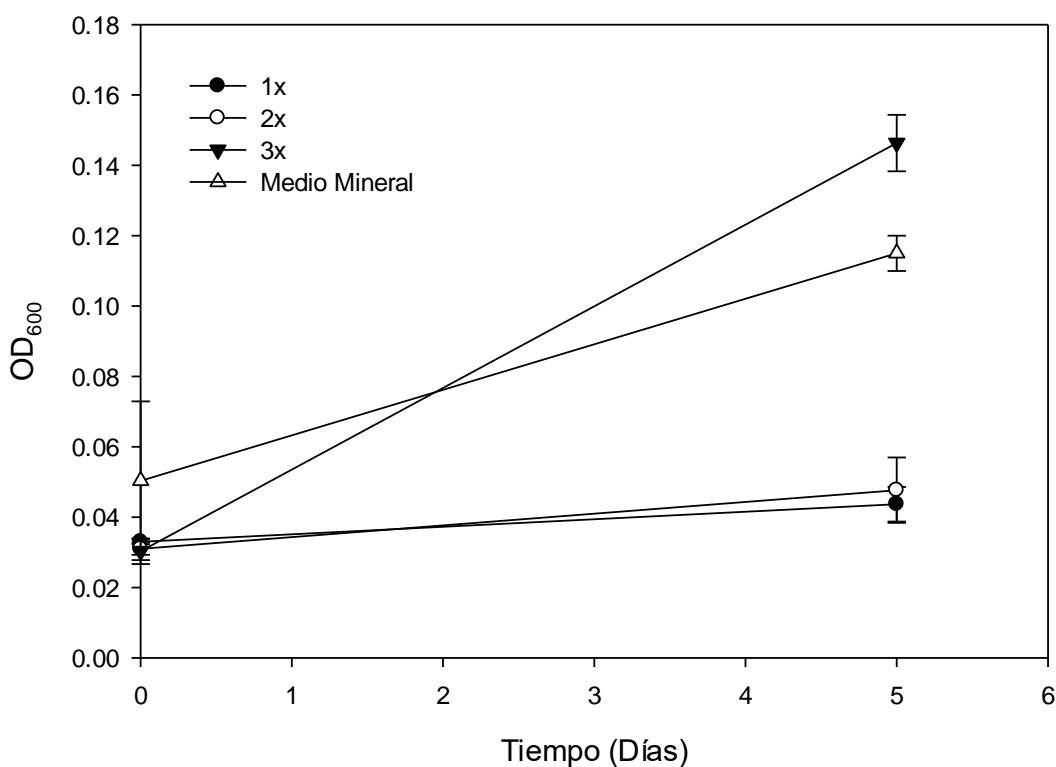


Figura. 17: Crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* en distintos medios con sacarosa a 1 g/L. Medio BG11 al 1x, 2x, 3x y medio mineral descrito anteriormente. Realizado por triplicado. Las barras en cada punto indica la desviación estándar de la muestra.

Entre las principales diferencias de los medios analizados es la cantidad de iones sulfato, magnesio, potasio y fósforo, las cuales se encuentran en mayor cantidad en el medio mineral que en el medio BG11; sin embargo, al poder crecer *Corynebacterium glutamicum* en el medio BG11 3x el cual contiene concentraciones extremadamente bajas de estas estos iones, podemos argumentar que no es un factor limitante la concentración de éstos en el medio BG11 (Du *et al.*, 2013) para el crecimiento del microorganismo (**Figura. 18**). No obstante, en los medios de cultivo existen algunas diferencias en la cantidad de iones hierro y manganeso (**Figura. 19**). En el caso del ion hierro se tiene una mayor cantidad en todas las concentraciones del medio BG11; sin embargo, no presenta crecimiento bacteriano. El manganeso parece ser la especie química clave para el crecimiento de nuestra bacteria, ya que en medio mineral tiene una concentración de 0.0028 g/L el cual es mayor al presente en el medio BG11 1x y 2x (0.00079 y 0.0015 g/L), pero al utilizar la concentración mayor (3x) la concentración llega a un valor de 0.0023 g/L de manganeso, el cual se vuelve comparable con el que presenta el medio mineral. Al comparar estos resultados con los reportados en la literatura, se mantiene la proporción de magnesio con relación a los demás componentes atribuyéndolo a los requerimientos para estabilizar la membrana celular, ribosomas y como cofactor en reacciones metabólicas (Kaneko *et al.*, 1979).

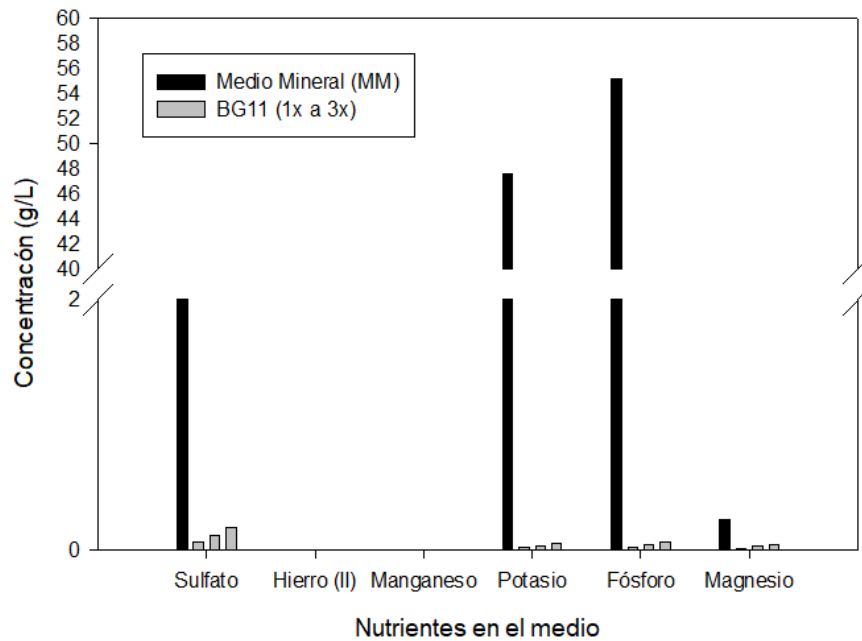


Figura. 18: Comparativa de iones presentes en el medio mineral y medio BG11.

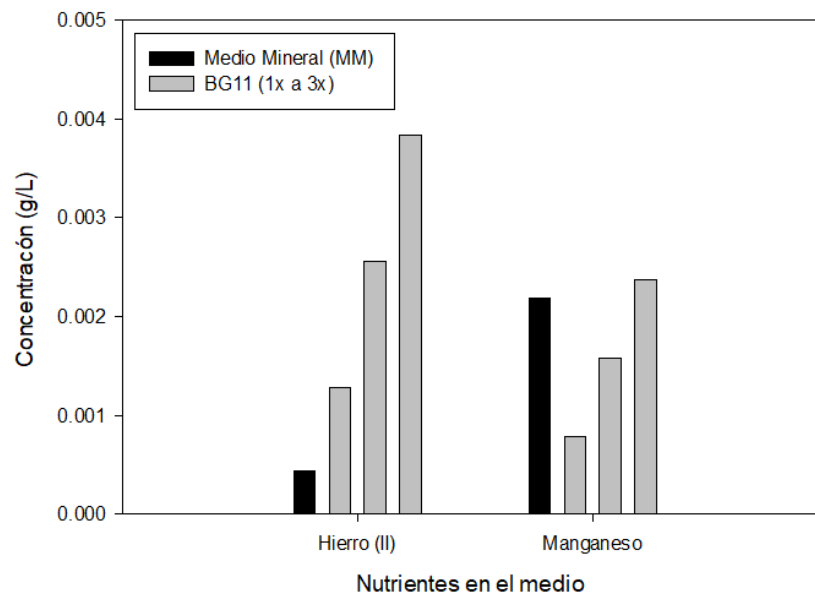


Figura. 19: Visualización detallada de los iones hierro (II) y manganeso. Resaltando la presencia de manganeso a una concentración similar en el medio BG11 3x.

Conclusiones

En el presente trabajo se diseñó y construyó una cianobacteria genéticamente modificada capaz de secretar sacarosa bajo condiciones de estrés, que a diferencia de lo previamente reportado es capaz de mantener esa capacidad en ausencia del antibiótico, ya que la modificación genética puede encontrarse en el genoma de esta. Estos resultados permiten continuar con la siguiente fase del proyecto con la perspectiva de diseñar y construir sistemas de co-cultivo para la producción de diversos metabolitos a nivel industrial.

Synechocystis recombinante tuvo la capacidad de secretar hasta 20 mg/L de azúcares totales sin alimentar aire al medio de cultivo y sin la necesidad de optimización de la producción, la cual es necesaria para garantizar la continuidad del proyecto.

Es necesario y recomendable adquirir un kit para cuantificación selectiva de sacarosa o bien realizar el análisis por HPLC a futuro, para tener herramientas analíticas de cuantificación más selectivas y específicas.

Corynebacterium glutamicum presentó la capacidad de crecer en el medio de cultivo de *Synechocystis* el medio BG11 a una concentración de 3x utilizando sacarosa como fuente de carbono. Se requieren análisis adicionales para verificar si este microorganismo es capaz de aprovechar este medio para producir ácido glutámico

Por último, debido a las evidencias presentadas en dicho proyecto podemos concluir que la construcción realizada fue exitosa de acuerdo con la caracterización molecular y el incremento de azúcares totales en el medio de cultivo.

Referencias

Amin G., y Al-Tlthi, A., (2007) “Production of L-glutamic acid by immobilized cell Reactor of the bacterium *Corynebacterium glutamicum* entrapped into Carrageenan gel beads.” En: *World Appl Sci J* Vol. 1, p. 62-67

Cabrera C., Zuaznábar C. (2010) ‘Impacto sobre el ambiente del monocultivo de la caña de azúcar con el uso de la quema para la cosecha y la fertilización nitrogenada. I. Balance del Carbono’, *SciELO*, 31(1), pp. 5–13.

Du W., Feiyan L., Yangkai D., (2013) ‘Exploring the photosynthetic production capacity of sucrose by cyanobacteria’, *Metabolic Engineering*. Elsevier, 19(May 2018), pp. 17–25. doi: 10.1016/j.ymben.2013.05.001.

DuBois M., Gilles K., (1956) ‘Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances’, *Analytical Chemistry*, 28(3), pp. 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017.

Ducat D., Avelar J., Way A.,(2012) ‘Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity’, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), pp. 2660–2668. doi: 10.1128/AEM.07901-11.

Eaton-Rye, J. J. (2004). The construction of gene knockouts in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Methods Mol. Biol.* 274, 309–324

Englund E., Andersen J., Miao R.,(2015) ‘Metabolic Engineering of *Synechocystis* sp.

PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide', *ACS Synthetic Biology*, 4(12), pp. 1270–1278. doi: 10.1021/acssynbio.5b00070.

pEERM3 Km was a gift from Pia Lindberg (Addgene plasmid # 64025 ; <http://n2t.net/addgene:64025> ; RRID:Addgene_64025)

Heinz S., Liauw P., Nickelsen J.,(2016) 'Analysis of photosystem II biogenesis in cyanobacteria', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1857(3), pp. 274–287. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.11.007.

Hernández A., (2003) *Microbiología Industrial*. Primera ed. Edited by V. Picado, Beatriz. Garcia. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.

Iijima H., Nakaya Y., Kuwahara A., Hirai MY., (2015) "Seawater cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 drastically alters amino acid composition and glycogen metabolism". *Front Microbiol.* 2015;6:326. Published 2015 Apr 22. doi:10.3389/fmicb.2015.00326

Kaback H., Wu J.,(1997) 'From membrane to molecule to the third amino acid from the left with a membrane transport protein', *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30(4), pp. 333–364. doi: 10.1017/S0033583597003387.

Kaneko H., Sakaguchi K. (1979). Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric Biol Chem* 43, 1007-1013.

Kima M., Lianga M., Heb Q.,(2016) 'A novel bioreactor to study the dynamics of co-culture systems', *Biochemical Engineering Journal*, 107, pp. 52–60. doi:

10.1016/j.bej.2015.11.019.

Madigan M., Brock T., Martinko J., (2009) ‘ in *Brock biología de los microorganismos.*, pp. 46, 422, 511, 536.

Nakao M., Okamoto, S., Kohar, M., (2010). The cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, D379–D381.

Oliveira P., and Lindblad P., (2008). An AbrB-Like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 190,1011–1019

Pao S., Paulsen T., Saier H.,(1998) ‘Major facilitator superfamily.’, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(1), pp. 1–34. doi: 1092-2172/98.

Pimentel D., Patzek W.,(2008) ‘Ethanol Production: Energy and Economic Issues Related to U.S. and Brazilian Sugarcane’, in *Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 357–371. doi: 10.1007/978-1-4020-8654-0_14.

Ramírez G., Queiroz L., Jacob E.,(2013) ‘Fotobiorreactor: Herramienta para cultivo de cianobacterias.’, *Ciencia y Tecnología*, 6(2), pp. 9–19. doi: ISSN 1390-4043.

Rittmann B.,(2008) ‘Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms’, *Biotechnology and Bioengineering*, 100(2), pp. 203–212. doi: 10.1002/bit.21875.

Salazar A., Sandoval A., Armendáriz J., (2013). *Biología molecular*. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.

Shyamkumar R., Muthu I., Karuppiah B.,(2014) ‘Production of L-glutamic acid with *corynebacterium glutamicum* (NCIM 2168) and *pseudomonas reptilivora* (NCIM 2598): A study on immobilization and reusability’, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 6(3), pp. 163–168.

Timilsina G., Beghin J., Mensbrugghe J.,(2012) ‘The impacts of biofuels targets on land-use change and food supply: A global CGE assessment’, *Agricultural Economics*, 43(3), pp. 315–332. doi: 10.1111/j.1574-0862.2012.00585.x.

Varela M., Hastings W., (1996) ‘Molecular biology of the lactose carrier of *Escherichia coli*’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1276(1), pp. 21–34. doi: 10.1016/0005-2728(96)00030-8.

West I.,(1997) ‘Ligand conduction and the gated-pore mechanism of transmembrane transport.’, *Biochimica et biophysica acta*, 1331(3), pp. 213–34. doi: 10.1016/s0304-4157(97)00007-5.

Yu Y., You L., Hollinshead D.,(2013) ‘Development of *synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory’, *Marine Drugs*, 11(8), pp. 2894–2916. doi: 10.3390/md11082894.

Zang X., Liu B., Liu S.,(2007) ‘Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803.’, *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 45(3), pp. 241–5. Available at:

Zhu X-G., Long S., Ort R.,(2008) ‘What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass?’, *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), pp. 153–159. doi: 10.1016/j.copbio.2008.02.004.

Anexos

Soluciones

Soluciones para extracción de DNA plasmídico (lisis alcalina)

Solución I (200 mL)

5 mL de Tris HCl 1M (pH 8.0)

4 mL de EDTA 0.5M (pH 8.0)

Aforar con agua destilada a 200 mL

Solución II (200mL)

4 mL de NaOH 10 N

2.0 g SDS

Aforar con agua destilada a 200 mL

Solución III (200mL)

58.8 g de acetato de potasio

23.0 mL de ácido acético

Aforar con agua destilada a 200 mL

TAE buffer (1L a 10X)

48.4 g de Tris base

11.4 mL de ácido acético glacial

3.7 g de EDTA

Jugo azul 1X

3 mL Glicerol absoluto (Concentración final, 30 %)

25 mg Azul de Bromofenol (Concentración final 0.25 %)

25 mg Xilencianol (Concentración final 0.25 %)

H₂O destilada hasta 10 mL

Secuencias

- Plasmído pEERM3 Km

AGGCTTCTCCTCCGGCATTGTGGCCACCCTCACCGCCAGTAAGGTCACCC
ATCGTAAAATTTCGTTCCATCGCCGCCCACTGCAAAAATTCCTCACCGAA
GCGGATTTTCTCAATAACGAAATTTTGATCCATCGCCAAACCACCGCTGA
TTGGAGCGCGGACTATGGCCAGGTATTGTATCGCCAGGATGGTCTAATCG
AAAAGGTTTACACCAGTAATATTGAACCTCTCCACGCTGAATTAGAACAT
TTTATTCATTGTGTTAGGGGAGGTGATCAACCCTCAGTGGGGGGAGAAA
GGCCCTCAAGGCCCTGAAGTTAGCCAGTTTAATTGAAGAAATGGCCCTG
GACAGTCAGGAATGGCATGGGGGGGAAGTTGTGACAGAATATCAAGATG
CCACCCTGGCCCTCAGTGCGAGTGTTTAAATCAACTTAATTAATGCAATT
ATTGCGAGTTCAAACCTCGATAACTTTGTGAAATATTACTGTTGAATTAAT
CTCCACTGCACATCAAAATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTTTCC
ACCAGCAAAATTCGCATCGCCTCTGCCTTTTTTTATAACGGTCTGATCTTA
GCGGGGGAAGGAGATTTTCACCTGAATTCATACCCCCTTTGGCAGACTG
GGAAAATCTTGGACAAATTCCCAATTTAGTGGAGGTTCTAGAACTAGTA
GCGGCCGCTGCAGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAG
ACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCTACTAGA
GTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATACTCGAGCT
GATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCACGTTGTG

TCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATG
AACATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATG
AGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCCAGGCCGCGATTAAATTCCAA
CATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGC
AATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGA
GTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATG
AGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATC
AAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGAT
CCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGT
GAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCCTGCGCCGGTTGCATTCGAT
TCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCA
GGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATG
ACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAA
GCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACT
TGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTG
GACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAA
CTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAAT
ATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTC
GATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAG
CATTACGCTGACTTGACGGGACTCGAGGGATCCCTCAGGGGCATTATCG
GAGCAAGCCGATATTCAGGTAAGATGGGGCGGTGCTTTTGTGGGTGAT
CCATTAGCTTTAACCCCATTTGTCTCCACTGACGGTAATAGTTTTCCCACT
GCGATTAATTGTTTTGTTTGGAGGAGGGACTGCCCCACCGTCAGCCCGCC
GCCATAGTTTTGCATTTCCACTGCCATGGGCATCGAACTCCGTAGTTACG

TTTACCTGGATAGTCTCCAGTCCCAACATGCAGCCTACATTGGGACGGTG
GCCTCCGGCTTTTTGCCGCTACCGGGGGATTGTTCCCTCTGGGTGGAAGT
TTCCCCAGGCATTGAAATTAACCGCATTACCGATATTGCTCTTAAGGCAG
CGGTGGTGCGGCCGGGGGTATTATTTGTGGAACGGCTCTACGGTTTGTTG
GAAATCCATGCCAGTAATCAGGGGGAAGTGCGGGCGGCAGGGCAAGCG
ATTTTGGCATATATCGGTGCCAAAGCCAGTGACTGCAAAAGAAGACCAT
ATACGTCTCCTATAGGTCTCGGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACG
GCGCAAGCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGCGCGTCGTT
CCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGAT
CCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCT
ACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA
AGGTA ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTG
TAGCCGTAGTTAGCCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGT
CGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA
GCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGA
ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG
GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT
TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC
GCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTC
TTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAG
TGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAG

TGAGCGAGGAAGCGGAAGGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAAC
TAAGCAGAAGGCCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAACTCTT
TCTGTGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCCCTGGGCGGT
TCTGATAACGAGTAATCGTTAATCCGCAAATAACGTAAAAACCCGCTTCG
GCGGGTTTTTTTATGGGGGGAGTTTAGGGAAAGAGCATTGTGTCAGAATAT
TTAAGGGCGCCTGTCACCTTGCTTGATATATGAGAATTATTTAACCTTAT
AAATGAGAAAAAAGCAACGCACCTTAAATAAGATACGTTGCTTTTTTCGA
TTGATGAACACCTATAATTAACTATTCATCTATTATTTATGATTTTTTGT
ATATACAATATTTCTAGTTTGTTAAAGAGAATTAAGAAAATAAATCTCGA
AAATAATAAAGGGAAAATCAGTTTTTGATATCAAATTATACATGTCAA
CGATAATACAAAATATAATACAACTATAAGATGTTATCAGTATTTATTA
TGCATTTAGAATACGTACTCAGCGTCTGGGTCCCCATCGGTGATGTCGT
ATAAGAGACGTATAGGAGACCTATAGTGTCTTCGGGG

- Gen *cscB*

ATGGCACTGAATATTCCATTCAGAAATGCGTACTATCGTTTTGCATCCAG
TTACTCATTTCTCTTTTTTATTTCTGGTCGCTGTGGTGGTCGTTATACGCT
ATTTGGCTGAAAGGACATCTAGGGTTGACAGGGACGGAATTAGGTACAC
TTTATTCGGTCAACCAGTTTACCAGCATTCTATTTATGATGTTCTACGGCA
TCG TTCAGGATAAACTCGGTCTGAAGAAACCGCTCATCTGGTGTATGAGT
TTCATCCTGGTCTTGACCGGACCGTTTATGATTTACGTTTATGAACCGTTA
CTGCAAAGCAATTTTTCTGTAGGTCTAATTCTGGGGGCGCTATTTTTTGGC
TTGGGGTATCTGGCGGGATGCGGTTTGCTTGATAGCTTCACCGAAAAAAT
GGCGCGAAATTTTCATTTCTGAATATGGAACAGCGCGCGCCTGGGGATCTT
TTGGCTATGCTATTGGCGCGTTCTTTGCCGGCATATTTTTTAGTATCAGTC
CCCATATCAACTTCTGGTTGGTCTCGCTATTTGGCGCTGTATTTATGATGA
TCAACATGCGTTTTTAAAGATAAGGATCACCAGTGCGTAGCGGCAGATGC
GGGAGGGGTAAAAAAGAGGATTTTATCGCAGTTTTCAAGGATCGAAAC
TTCTGGGTTTTTCGTCATATTTATTGTGGGGACGTGGTCTTTCTATAACATT
TTTGATCAACAACTTTTCTGTCTTTTATTCAGGTTTATTCGAATCACAC
GATGTAGGAACGCGCCTGTATGGTTATCTCAACTCATTCCAGGTGGTACT
CGAAGCGCTGTGCATGGCGATTATTCCTTTCTTTGTGAATCGGGTAGGGC
CAAAAAATGCATTACTTATCGGAGTTGTGATTATGGCGTTGCGTATCCTT
TCCTGCGCGCTGTTTCGTTAACCCCTGGATTATTTCAATTAGTGAAGTTGTTA
CATGCCATTGAGGTTCCACTTTGTGTCATATCCGTCTTCAAATACAGCGT
GGCAAACTTTGATAAGCGCCTGTCGTCGACGATCTTTCTGATTGGTTTTTC
AAATTGCCAGTTCGCTTGGGATTGTGCTGCTTTCAACGCCGACTGGGATA

CTCTTTGACCACGCAGGCTACCAAACAGTTTTCTTCGCAATTTTCGGGTAT
GTCTGCCTGATGTTGCTATTTGGCATTTCCTTCTTGAGTAAAAACGCGA
GCAAATAGTTATGGAAACGCCTGTACCTTCAGCAATATAG

- Gen *cscB* optimizado

CTAGAATGGCGTTGAACATCCCATTTTCGGAACGCGTACTATCGCTTCGCG
TCCTCCTATAGTTTCCTCTTTTTCATCAGCTGGTCCCTGTGGTGGTCCCTC
TACGCTATTTGGCTAAAGGGGCACTTGGGGTTGACGGGCACCGAGTTGG
GCACCCTATACAGCGTGAATCAATTTACCTCCATTCTCTTCATGATGTTCT
ATGGTATTGTCCAGGATAAACTGGGGCTAAAGAAGCCGCTCATCTGGTG
CATGTCCTTTATTCTAGTATTGACCGGACCGTTCATGATTTATGTATATGA
ACCCCTACTCCAGAGCAACTTCTCCGTGGGCCTGATCTTGGGGGCGCTAT
TCTTTGGGCTCGGTTATCTGGCCGGTTGCGGTCTACTGGATAGCTTCACT
GAGAAGATGGCACGCAACTTTCATTTTGAGTACGGGACGGCACGCGCAT
GGGGGTCCTTTGGATACGCAATTGGTGCCTTCTTTGCGGGAATCTTCTTTT
CCATTTCTCCCCATATTAACCTTTTGGTTGGTTTCTCTCTTCGGAGCCGTAT
TTATGATGATCAACATGCGATTTAAAGATAAAGACCACCAATGCGTGGC
CGCGGACGCTGGAGGCGTTAAGAAAGAGGACTTTATCGCAGTGTTCAAA
GACCGCAATTTTGGGTTTTTCGTGATCTTCATCGTTGGTACGTGGAGTTTC
TACAATATTTTCGATCAACAACCTATTCCCCGTCTTTTACAGCGGCTTATTT
GAGTCTCACGACGTTGGCACACGCCTATATGGTTATCTCAACAGCTTCCA

GGTTGTACTGGAGGCGTTATGCATGGCCATTATTCCATTTTTTTGTCAATCG
AGTCGGCCCAAAGAATGCTCTGTTAATTGGAGTGGTAATCATGGCACTGC
GAATTCTGAGCTGCGCTCTGTTTGTCAATCCGTGGATCATTAGTCTCGTA
AAGCTGCTCCATGCGATTGAGGTGCCTTTATGCGTCATTTCCGTGTTCAA
ATACTCTGTTGCTAATTTTGACAAACGCCTAAGTTCCACAATCTTTTAAAT
CGGCTTCCAAATTGCCTCCTCTCTGGGTATTGTACTCCTGAGTACACCAA
CTGGAATCCTGTTTGACCATGCAGGATATCAAACCGTGTTCTTTGCCATT
AGTGGAATTGTTTGTTTAATGCTGCTATTCGGCATCTTCTTCCTGAGTAAA
AAACGGGAGCAGATCGTTATGGAAACTCCGGTACCAAGCGCGATCTAGC
TGCA